



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**Università degli Studi di Padova**

**Dipartimento di Scienze del Farmaco**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE**

**INDIRIZZO: Farmacologia Molecolare e Cellulare**

**XXVII CICLO**

**CARATTERIZZAZIONE PRECLINICA *IN VITRO*  
DI NUOVI INIBITORI NON PEPTIDOMIMETICI  
DELLA GLUTATIONE TRASFERASI P1-1**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Pietro Giusti

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Pietro Giusti

**Supervisore:** Dott. Luigi Quintieri

**Dottorando:** Laura Calderan



Parte dei risultati riportati in questa Tesi sono stati presentati ai seguenti congressi:

- 17° Seminario Nazionale della Società Italiana di Farmacologia (SIF) per Dottorandi ed Assegnisti in Farmacologia e Scienze affini, Rimini, 16-18 Settembre 2014;
- 20<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Stuttgart (Germany), May 18-22, 2014;
- 36° Congresso Nazionale SIF, Torino, 23-26 Ottobre 2013;
- 16° Seminario Nazionale SIF per Dottorandi ed Assegnisti in Farmacologia e Scienze affini, Rimini, 16-19 Settembre 2012.



# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Le glutathione trasferasi</b>	<b>9</b>
<i>1.1.1. Generalità</i>	<i>9</i>
<i>1.1.2. Classificazione e nomenclatura</i>	<i>10</i>
<i>1.1.3. Struttura e meccanismo catalitico</i>	<i>11</i>
<i>1.1.4. Metabolismo e detossificazione di xenobiotici e sostanze endogene</i>	<i>13</i>
<i>1.1.5. Funzioni non catalitiche</i>	<i>14</i>
<i>1.1.6. Sovraespressione nei tumori e ruolo nella resistenza a farmaci antitumorali</i>	<i>15</i>
<i>1.1.7. GST quali bersagli molecolari nel trattamento dei tumori umani</i>	<i>17</i>
<b>1.2. Inibitori di GST e profarmaci attivati via GST</b>	<b>18</b>
<i>1.2.1. Inibitori di GST</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2. Profarmaci attivati via GST</i>	<i>22</i>
<b>1.3. La sulfasalazina (SASP) e i suoi analoghi strutturali</b>	<b>24</b>
<b>1.4. Il 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e il suo analogo strutturale MC3181</b>	<b>27</b>
<b>1.5. La biotrasformazione degli xenobiotici</b>	<b>29</b>
<i>1.5.1. Generalità e importanza della biotrasformazione degli xenobiotici</i>	<i>29</i>
<i>1.5.2. Variabilità legata al sesso e variabilità interspecie</i>	<i>30</i>
<i>1.5.3. Gli studi di biotrasformazione dei farmaci</i>	<i>31</i>
<i>1.5.4. Classificazione delle reazioni di biotrasformazione</i>	<i>32</i>
<i>1.5.4.1. Reazioni di ossidazione microsomiali</i>	<i>33</i>
<i>1.5.4.2. Reazioni di ossidazione mediate da alcol deidrogenasi e</i>	

<i>aldeide deidrogenasi</i>	35
<i>1.5.4.3. Reazioni di glucuronidazione</i>	36
<b>2. CONTESTO E SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>39</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	<b>41</b>
<b>3.1. Reagenti</b>	<b>41</b>
<b>3.2. Valutazione della stabilità di NBDHEX e di MC3181 al metabolismo epatico microsomiale e citosolico</b>	<b>42</b>
<i>3.2.1. Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con microsomi epatici umani, di ratto e di topo, in presenza di UDPGA</i>	42
<i>3.2.2. Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con microsomi epatici umani, di ratto e di topo, in presenza di NADPH</i>	43
<i>3.2.3. Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con citosol di fegato umano, di ratto e di topo, in presenza di NAD<sup>+</sup></i>	44
<i>3.2.4. Incubazione di NBDHEX con citosol di fegato umano, di ratto maschio e di topo maschio, in presenza di NAD<sup>+</sup> e di 4-MP</i>	45
<i>3.2.5. Analisi HPLC</i>	45
<i>3.2.6. Analisi LC-DAD-MS/MS</i>	46
<b>3.3. Biosintesi, isolamento ed analisi di risonanza magnetica nucleare (NMR) del prodotto di coniugazione dell’NBDHEX con acido glucuronico (NBDHEX-glucuronide)</b>	<b>48</b>
<i>3.3.1. Biosintesi dell’NBDHEX-glucuronide e sua purificazione mediante HPLC semipreparativa</i>	48
<i>3.3.2. Analisi NMR</i>	49
<b>3.4. Valutazione dell’effetto inibitorio della SASP e dei suoi analoghi sull’attività coniugativa della GST isolata da placenta umana</b>	<b>49</b>
<i>3.4.1. Condizioni di incubazione</i>	49
<i>3.4.2. Determinazione del GS-DNB mediante analisi HPLC</i>	50
<b>3.5. Valutazione dell’effetto inibitorio di EML340, EML277, EML259 ed EML337 sull’attività coniugativa di GST A1-1, M1-1 e P1-1 umane ricombinanti</b>	<b>52</b>

<b>3.6. Studi di citotossicità <i>in vitro</i></b>	<b>52</b>
<b>3.7. Analisi dei dati</b>	<b>53</b>
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>55</b>
<b>4.1. Caratterizzazione <i>in vitro</i> della biotrasformazione epatica del 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e del suo analogo strutturale MC3181</b>	<b>55</b>
4.1.1. Studi di glucuronidazione	56
4.1.2. Caratterizzazione preliminare del metabolismo microsomiale dipendente da nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH)	63
4.1.3. Studi di ossidazione mediata da enzimi citosolici dipendenti da nicotinammide adenina dinucleotide ossidato (NAD <sup>+</sup> )	71
<b>4.2. Caratterizzazione <i>in vitro</i> di analoghi strutturali della sulfasalazina quali inibitori della glutatione trasferasi P1-1 umana</b>	<b>77</b>
4.2.1. Valutazione dell'effetto inibitorio sull'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana	77
4.2.2. Valutazione della selettività d'azione nei confronti di proteine GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1 umane ricombinanti	83
4.2.3. Studi di citotossicità <i>in vitro</i>	84
4.2.4. Studio dell'interazione tra GSTP1-1 umana e derivati benzimidazolici: analisi relative al composto EML340	89
<b>5. CONCLUSIONI RIASSUNTIVE</b>	<b>91</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>103</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>111</b>





## RIASSUNTO

Le glutatione trasferasi (glutatione *S*-trasferasi, GST) promuovono la detossificazione di numerose sostanze esogene ed endogene elettrofile tramite catalisi della loro coniugazione con glutatione ridotto. Alcune GST, tra cui la GSTP1-1, partecipano inoltre alla regolazione di processi quali l'apoptosi e la proliferazione cellulare mediante interazione con *mitogen activated protein* chinasi [Ruzza *et al.*, 2009].

Alcune GST, in particolare la GSTP1-1, sono notoriamente sovraesprese in numerosi tumori umani, e tale sovraespressione concorre a conferire un fenotipo di poliresistenza a farmaci antineoplastici. Nel corso degli anni sono stati dunque identificati e studiati svariati inibitori di GST o profarmaci attivati da tali proteine; nessuno di essi, tuttavia, è attualmente in uso clinico per la terapia dei tumori [Ruzza *et al.*, 2009; Sau *et al.*, 2010].

Fra gli inibitori di GST ad oggi identificati si annoverano il 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e il suo analogo strutturale MC3181, entrambi inibitori potenti della GSTP1-1 umana e in fase di valutazione preclinica quali agenti antitumorali [Ricci *et al.*, 2005; Pasello *et al.*, 2011; De Luca *et al.*, 2014]. Un primo obiettivo dell'attività svolta nell'ambito del Dottorato di Ricerca era l'ottenimento di informazioni circa la stabilità metabolica dei due candidati farmaci, considerata l'attuale assenza di informazioni a riguardo. Tale analisi è stata effettuata mediante l'utilizzo, quali fonti degli enzimi di biotrasformazione, di frazioni subcellulari epatiche microsomiali e citosoliche umane, murine, e di ratto. Sono state considerate in particolare le reazioni di ossidazione microsomiale mediata da enzimi richiedenti nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH), di coniugazione con acido glucuronico, e di ossidazione citosolica mediata da enzimi adenina dinucleotide ossidato (NAD<sup>+</sup>)-dipendenti.

I risultati ottenuti mediante cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC) e cromatografia liquida accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi e spettrometria di massa tandem (LC-DAD-MS/MS) dimostrano come entrambi i composti in esame vadano incontro, in tutte le specie considerate, a glucuronidazione, con formazione di un solo prodotto di reazione, e ad ossidazione microsomiale richiedente NADPH, con formazione di almeno due metaboliti. L'NBDHEX, ma non l'MC3181, è soggetto inoltre ad

ossidazione citosolica NAD<sup>+</sup>-dipendente mediata da alcol deidrogenasi, con formazione di un unico prodotto di reazione.

Il glucuronide dell'NBDHEX è stato ulteriormente caratterizzato mediante analisi di risonanza magnetica nucleare.

Lo studio ha messo in evidenza l'esistenza di differenze interspecie nella velocità di glucuronidazione di entrambi i composti, e, nel ratto, di differenze tra i due sessi nella velocità di glucuronidazione dell'MC3181 e di ossidazione citosolica dell'NBDHEX.

Tra gli inibitori di GSTP1-1 ad oggi noti vi è anche l'antinfiammatorio-immunomodulatore sulfasalazina (salicilazosulfapiridina, SASP) [Ahmad *et al.*, 1992], il quale, tuttavia, si mostra poco adatto all'utilizzo *in vivo* nella terapia dei tumori, principalmente a causa della scarsa biodisponibilità orale e della marcata instabilità metabolica, riconducibile per lo più alla presenza di un gruppo azoico [Klotz, 1985]. Una seconda parte del lavoro svolto durante il Dottorato di Ricerca ha avuto come obiettivo la valutazione *in vitro* di 30 nuovi analoghi strutturali della SASP quali potenziali inibitori della GSTP1-1 umana per il trattamento dei tumori. Tutti gli analoghi considerati (EML) si caratterizzano per la sostituzione del gruppo azoico tipico della SASP con un anello imidazolico. Ulteriori modifiche sono state apportate a carico della porzione sulfonamidica e/o aminosalicilica della SASP.

Sette dei 31 analoghi studiati (EML340, EML277, EML259, EML337, EML357, EML279, ed EML338) esercitano un effetto inibitorio nei confronti dell'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana (principalmente GSTP1-1) superiore a quello della SASP; il legame azoico non appare dunque essenziale ai fini dell'attività inibitoria nei confronti dell'enzima.

In saggi di inibizione enzimatica basati sull'impiego delle proteine umane ricombinanti GST A1-1, M1-1 e P1-1, il composto EML337 mostra un'inibizione preferenziale nei confronti della GSTP1-1. EML277 ed EML340 esibiscono invece marcata selettività d'azione nei confronti della forma GSTM1-1.

Infine, gli esterifili EML259, EML337 ed EML339 dimostrano, in esperimenti preliminari *in vitro*, attività inibitoria sulla crescita delle linee di melanoma umano A375 e SK-MEL 23, esprimenti GSTP1-1 [Depeille *et al.*, 2005; Hoey *et al.*, 2009].

## SUMMARY

Glutathione transferases (formerly glutathione *S*-transferases, GSTs) are a superfamily of enzymes involved in the glutathione (GSH)-dependent detoxification of a wide range of chemicals, including drugs. Moreover, certain members of this superfamily interact with and modulate the activity of protein kinases involved in key cellular processes, including proliferation and apoptosis [Ruzza *et al.*, 2009]. Among them, GSTP1-1 is frequently overexpressed in a variety of human tumors, where it contributes to conferring resistance to different anticancer agents. In light of these observations, several GST inhibitors or GST-activated prodrugs have been investigated throughout the years; however, none of them has been approved for use as antitumor drug [Ruzza *et al.*, 2009; Sau *et al.*, 2010].

6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) and its structural analogue MC3181 are promising anticancer agents with potent inhibitory activity towards GSTP1-1 [Ricci *et al.*, 2005; Pasello *et al.*, 2011; De Luca *et al.*, 2014]. A first aim of this work was to evaluate the metabolic fate of these compounds in humans and in laboratory animal species. The metabolic stability of NBDHEX and MC3181 was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) or LC coupled to diode array detection and tandem mass spectrometry (LC-DAD-MS/MS), upon incubation of each drug with human, mouse or rat liver microsomes or cytosol as enzyme source. The reactions investigated were UDP-glucuronic acid (UDPGA)-dependent glucuronidation, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent microsomal oxidation, and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)-dependent cytosolic oxidation.

Both NBDHEX and MC3181 underwent glucuronidation and microsomal NADPH-dependent oxidation in all of the investigated species. Moreover, NBDHEX, but not MC3181, underwent alcohol dehydrogenase-dependent oxidation in both human, rat and mouse cytosol.

The identity of NBDHEX glucuronide was confirmed by nuclear magnetic resonance analyses.

Finally, interspecies differences were identified in the glucuronidation of both compounds and in the cytosolic oxidation of NBDHEX, while sex-related

differences were observed in the rate of glucuronidation of MC3181 as well as in the rate of cytosolic oxidation of NBDHEX.

Sulfasalazine (sulfasalazopyridine; SASP), a drug currently used to treat rheumatic and inflammatory bowel diseases, is a non-substrate inhibitor of various human GSTs, including GSTP1-1 [Ahmad *et al.*, 1992]. Despite this, its poor oral bioavailability and metabolic instability (which is mainly linked to the presence of an azo group in its structure) hinder its use as an anticancer agent. In this work, 30 SASP analogues containing an imidazole ring in substitution of the azo group of SASP (i.e. salicylbenzoimidazole derivatives, EML), have been investigated as potential inhibitors of human GSTP1-1. Further structural modifications involved the sulfonamide as well as the aminosalicylic moiety of the drug.

Seven out of 30 of the salicylbenzoimidazole derivatives studied (i.e. EML340, EML277, EML259, EML337, EML357, EML279, and EML338) inhibited human placental GST (mostly GSTP1-1) conjugation activity more efficiently than the parent compound, SASP. Thus, the azo group seems to be not essential for inhibition of the enzyme activity.

Further enzyme inhibition assays carried out using human recombinant GST A1-1, M1-1 and P1-1, showed that EML337 displays a certain grade of selectivity for GSTP1-1, while EML340 and EML277 were highly selective towards GSTM1-1. Finally, preliminary *in vitro* cytotoxicity assays indicate that the methyl esters EML259, EML337 and EML339 can interfere with the growth of A375 and SK-MEL 23 human melanoma cell lines.

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. Le glutathione trasferasi

### 1.1.1. Generalità

Le glutathione trasferasi (EC 2.5.1.18), note in passato come “glutathione S-trasferasi” (da cui l’acronimo “GST”), costituiscono una superfamiglia multigenica di proteine espresse dalla maggior parte degli organismi viventi. Le GST sono primariamente enzimi di biotrasformazione di fase II responsabili della detossificazione di numerose sostanze esogene ed endogene elettrofile, di cui catalizzano la coniugazione con glutathione ridotto (GSH,  $\gamma$ -glutamyl-cisteinil-glicina, Figura 1). I coniugati con GSH sono più idrosolubili dei composti elettrofili da cui derivano, generalmente privi di una significativa attività biologica, e facilmente escreti grazie all’intervento di trasportatori di efflusso della superfamiglia *ATP-binding cassette* (ABC) [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009]. Alcune GST sono inoltre in grado di catalizzare reazioni non coniugative (riduzione, perossidazione e isomerizzazione *cis-trans*) nonché di coniugazione del GSH a residui proteici di cisteina (*S*-glutathionilazione), modificazione post-traduzionale che può influire, tra l’altro, sulla funzione delle proteine substrato. Enzimi appartenenti alla superfamiglia GST sono coinvolti, oltre che nel metabolismo di xenobiotici, anche nella biosintesi di sostanze endogene fra cui, in particolare, leucotrieni, prostaglandine e ormoni steroidei. Infine, tali proteine possiedono anche funzioni non catalitiche, come il legame di diverse sostanze non substrato e la regolazione di vie di segnalazione cellulare mediante interazione con altre proteine cellulari la cui attività viene ad essere modulata (vedi “1.1.5. Funzioni non catalitiche”) [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009; Tew e Townsend, 2011].

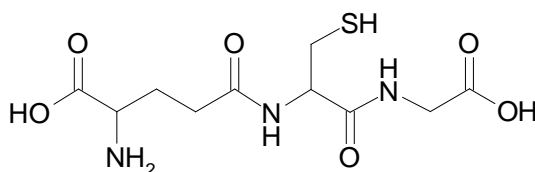
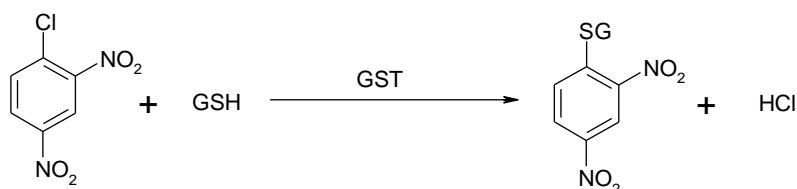


Figura 1. Formula di struttura del GSH

### 1.1.2. Classificazione e nomenclatura

Sulla base della localizzazione subcellulare, le GST eucariotiche sono state suddivise in 3 famiglie: citosoliche, mitocondriali e microsomiali, queste ultime anche dette “*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*” (MAPEG). Tutte e tre le famiglie contengono proteine che, pur avendo proprietà diverse, possiedono attività perossidasi GSH-dipendente, e sono in grado di catalizzare la reazione di coniugazione del GSH al substrato elettrofilo 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Figura 2) [Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009]. Le GST citosoliche e mitocondriali sono proteine solubili dimeriche, hanno somiglianza strutturale, e catalizzano la maggior parte delle reazioni di coniugazione di xenobiotici con GSH; le MAPEG sono, per contro, proteine trimeriche strutturalmente distinte dalle GST solubili, e coinvolte, principalmente, nella biosintesi di prostanoidi e leucotrieni [Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009].



**Figura 2. Reazione di coniugazione del GSH al CDNB mediata da GST**

Le GST citosoliche di mammifero sono state suddivise, sulla base di vari criteri, tra cui l'identità di sequenza aminoacidica, la specificità di substrato, la cross-reattività immunologica e la somiglianza nella struttura terziaria/quaternaria, in 7 classi, indicate con le lettere dell'alfabeto greco: *Alpha*, *Mu*, *Omega*, *Pi*, *Sigma*, *Theta* e *Zeta*, e abbreviate con le lettere dell'alfabeto romano: A, M, O, P, S, T e Z. Altre classi di GST citosoliche, quali la *Beta* (B), la *Delta* (D), la *Lambda* (L), la *Phi* (F) e la *Tau* (U) sono state individuate in organismi non mammiferi, inclusi piante e batteri. Per quanto riguarda le GST mitocondriali, nei mammiferi è stata identificata la classe denominata *Kappa* (K). Membri della stessa classe presentano solitamente un'identità di sequenza aminoacidica maggiore del 60%, membri di classi diverse inferiore al 30%.

Le MAPEG, individuate in vari organismi in natura, sono state invece suddivise in 4 sottogruppi (I-IV), in base all'identità di sequenza aminoacidica (superiore al

20% in ogni sottogruppo); le sei MAPEG umane identificate appartengono ai sottogruppi I, II e IV [Ruzza *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2005].

L'attuale sistema di nomenclatura adottato per le GST solubili di mammifero prevede l'uso dell'acronimo GST, seguito dalla lettera dell'alfabeto romano indicante la classe di appartenenza e da una combinazione di numeri arabi indicante la composizione in subunità. La specie da cui deriva la proteina può essere precisata con la prima lettera della specie stessa, scritta in minuscolo e posta come prefisso, mentre le varianti alleliche delle subunità possono essere aggiunte dopo i numeri relativi alle subunità, in forma di lettere dell'alfabeto romano scritte in minuscolo. Ad esempio, "hGSTM1a-1b" indica la GST umana di classe M, omodimero composto da due subunità GSTM1, codificate dagli alleli 1a e 1b [Ruzza *et al.*, 2009; Mannervik *et al.*, 2005].

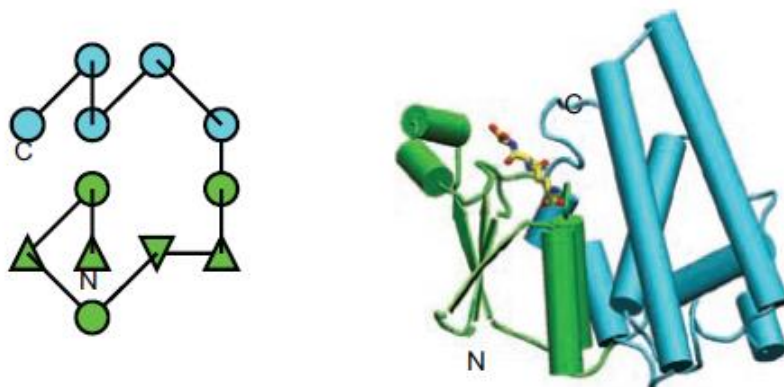
### 1.1.3. Struttura e meccanismo catalitico

Quasi tutte le GST solubili sono attive come omo- o eterodimeri aventi massa molecolare pari a circa 50 kDa; gli eterodimeri sono costituiti da subunità appartenenti alla stessa classe [Ruzza *et al.*, 2009; Oakley, 2011].

La struttura tridimensionale di diverse GST solubili è stata determinata mediante cristallografia a raggi X. Per quanto riguarda le GST citosoliche, ogni subunità presenta un sito attivo contenente un sito di legame per il GSH (definito "sito G") e, adiacente a questo, un sito di legame per i substrati elettrofili della reazione coniugativa, generalmente idrofobici (definito "sito H", da "*Hydrophobic*"). Inoltre, ogni subunità è composta da un dominio N-terminale, piuttosto conservato tra le diverse classi di enzimi, e da un dominio C-terminale, al contrario meno conservato. Il dominio N-terminale delle GST citosoliche presenta un ripiegamento in strutture  $\alpha$  e  $\beta$  analogo a quello della tioredossina ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ) e contiene gran parte del sito G, mentre il dominio C-terminale è costituito da  $\alpha$ -eliche e forma gran parte del sito H (Figura 3). La diversità tra GST nella composizione in residui aminoacidici idrofobici del sito H può determinarne una differente selettività nei confronti di un substrato [Armstrong, 1997; Oakley, 2011; Ruzza *et al.*, 2009].

Le GST mitocondriali presentano analogie e differenze strutturali con le GST citosoliche. Le subunità di tali enzimi sono costituite anch'esse da un dominio con ripiegamento in strutture  $\alpha$  e  $\beta$  analogo a quello della tioredossina, ma all'interno di questo dominio si inserisce un secondo dominio composto da  $\alpha$ -eliche, responsabile del legame dei substrati idrofobici. Analogamente alle GST

citosoliche, anche nelle GST mitocondriali il sito G è formato dal dominio con struttura analoga a quella della tioredossina [Hayes *et al.*, 2005; Oakley, 2011].



**Figura 3. Topologia e struttura tridimensionale di una subunità di una GST citosolica.** Il dominio N-terminale è rappresentato in verde, il dominio C-terminale in azzurro; nella struttura tridimensionale è raffigurato anche il GSH (modello a bastoncini) [tratta da Oakley, 2011].

Alla base dell'attività catalitica di coniugazione al GSH manifestata dalle GST vi è la capacità di tali enzimi di abbassare il  $pK_a$  del gruppo sulfidrilico del GSH da circa 9,0 in soluzione acquosa a circa 6,5-7,4 quando legato al sito attivo, così da facilitare la formazione dell'anione tiolato  $GS^-$ , che costituisce la vera specie reattiva. Studi di cristallografia a raggi X ed esperimenti di mutagenesi sito-diretta hanno mostrato come un residuo aminoacidico di tirosina o di serina nel sito G nel dominio N-terminale, conservato nelle diverse classi di GST solubili, stabilisca un legame idrogeno con il gruppo tiolico del GSH, e risulti così coinvolto nel favorire l'abbassamento del pH e la formazione e la stabilizzazione dell'anione tiolato nel sito attivo dell'enzima. Alcune GST citosoliche (in particolare, le GST di classe *Omega* e *Beta*) possiedono, al posto della tirosina o della serina, un residuo di cisteina, il quale crea un disolfuro misto con il GSH; tali enzimi sembrano responsabili di reazioni di riduzione piuttosto che di coniugazione con GSH [Hayes e Pulford, 1995; Ruzza *et al.*, 2009; Oakley, 2011].

Anche la struttura tridimensionale di alcune MAPEG è stata determinata mediante tecniche cristallografiche. Tali GST sono attive come omo- o eterotrimeri, aventi subunità di massa molecolare pari a circa 14-17 kDa e costituite da un gruppo di quattro  $\alpha$ -eliche transmembrana. Vi sono tre siti di legame del GSH per ogni trimero, e, così come per le GST solubili, alcuni residui



aminoacidici sembrano essere responsabili della formazione e della stabilizzazione dell'anione tiolato GS<sup>-</sup> [Ruzza *et al.*, 2009; Oakley, 2011].

#### 1.1.4. Metabolismo e detossificazione di xenobiotici e sostanze endogene

Come detto in precedenza, molte GST sono coinvolte primariamente nella biotrasformazione e detossificazione di sostanze esogene ed endogene mediante la loro coniugazione con il tripeptide GSH. I substrati della reazione coniugativa delle GST sono generalmente idrofobici e presentano un centro elettrofilo, quale un atomo di carbonio, azoto, ossigeno o zolfo; la reazione avviene per attacco nucleofilo del gruppo sulfidrilico del GSH all'atomo elettrofilo del substrato. Un esempio di tale reazione, nello specifico una sostituzione nucleofila aromatica, è la suddetta coniugazione del GSH al CDNB (Figura 2). Reazioni di coniugazione del GSH a substrati elettrofili possono avvenire anche non enzimaticamente, in particolare a valori di pH alti, maggiori di 8-9 [Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009].

Le GST agiscono come enzimi di detossificazione, dal momento che i prodotti delle reazioni di coniugazione con GSH sono, nella maggior parte dei casi, meno reattivi dei composti di partenza nei confronti di macromolecole cellulari. Inoltre, i prodotti di coniugazione con GSH sono, di regola, rapidamente estrusi dalla cellula all'interno della quale si formano; ciò si realizza grazie all'intervento di trasportatori di efflusso della superfamiglia ABC, in particolare le proteine *multidrug resistance-related protein 1* (MRP1; ABCC1) e MRP2 (ABCC3) [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009; Keppler, 1999]. Una volta estrusi nei fluidi extracellulari, i coniugati del GSH sono generalmente metabolizzati attraverso la via degli acidi mercapturici ed escreti con le urine e la bile. La coniugazione con GSH può essere considerata infatti il primo *step* nella sintesi degli acidi mercapturici (coniugati della N-acetil cisteina); le reazioni successive prevedono l'intervento in sequenza degli enzimi  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi ( $\gamma$ -GT), cisteinil-glicinasi e N-acetiltrasferasi [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009]. Le GST concorrono dunque non solo a rendere i substrati elettrofili potenzialmente dannosi meno reattivi, ma anche a favorirne l'allontanamento dalle cellule e dall'organismo. E' stato scoperto, tuttavia, che vi sono alcuni casi in cui i prodotti di coniugazione con GSH risultano più reattivi e più citotossici del composto di partenza [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005; Ruzza *et al.*, 2009].

Gli xenobiotici substrato di GST sono molecole di natura chimica varia e includono farmaci antitumorali, pesticidi, erbicidi, inquinanti ambientali e carcinogeni, o loro metaboliti. Come già detto, le GST mediano anche la detossificazione, per coniugazione con GSH, di sostanze endogene, in particolare prodotti di ossidazione, potenzialmente dannose per le macromolecole cellulari. La detossificazione di alcune di tali sostanze da parte delle GST si verifica anche mediante reazioni di riduzione [Hayes e Pulford, 1995; Hayes *et al.*, 2005].

#### 1.1.5. Funzioni non catalitiche

Molte GST hanno la capacità di legare, covalentemente o non covalentemente, una grande varietà di composti, proprietà per cui questi enzimi erano chiamati in passato “ligandine”. Le GST legano non covalentemente composti lipofili non substrato, quali bilirubina, eme, sali biliari, acidi grassi, ormoni tiroidei, vari steroidi e alcuni farmaci. Spesso tale legame è associato a un’inibizione non competitiva dell’attività enzimatica coniugativa, e si pensa possa facilitare il trasporto dei ligandi idrofobici nella fase acquosa cellulare. La funzione di “ligandine” potrebbe anche evitare l’interazione di composti citotossici con molecole bersaglio intracellulari [Litwack *et al.*, 1971; Hayes e Pulford, 1995; Ruzza *et al.*, 2009; Oakley *et al.*, 1999].

Studi recenti hanno dimostrato come alcune GST citosoliche interagiscano inoltre con proteine cellulari, in particolare chinasi dei *pathways* delle *mitogen activated protein* (MAP) chinasi, responsabili di diversi processi cellulari quali proliferazione, differenziamento e apoptosi. L’interazione tra GST e chinasi maggiormente caratterizzata è quella tra GSTP1-1 e la MAP chinasi *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) [Laborde, 2010; Tew e Townsend, 2012; Ruzza *et al.*, 2009]. Le JNK sono chinasi attivate da vari stimoli di *stress* e da citochine; esse fosforilano e attivano a loro volta, tra le altre, la proteina c-Jun, evento che conduce all’induzione dell’espressione di geni *target* coinvolti in differenti processi cellulari quali la proliferazione e la morte cellulare. L’effetto finale dell’attivazione di JNK sembra dipendere dalla tipologia e dalla durata dello stimolo, e dal tipo cellulare: un’attivazione transitoria delle chinasi promuoverebbe la sopravvivenza cellulare, mentre un’attivazione prolungata determinerebbe apoptosi [Davis *et al.*, 2000; Karin e Gallagher, 2005; Bode e Dong, 2007].

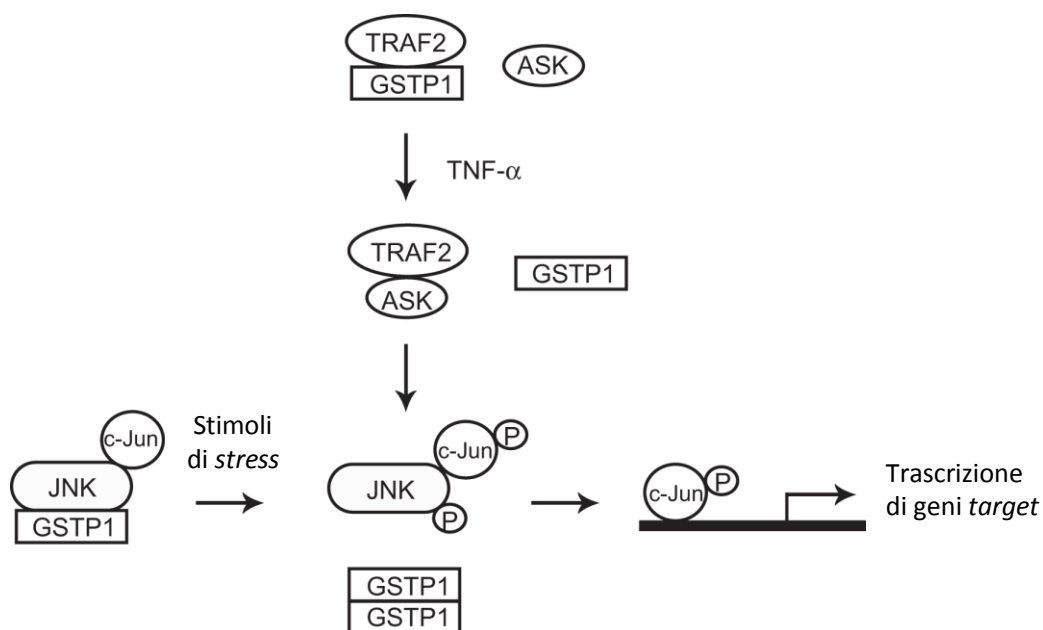
In seguito a studi *in vitro*, è stato proposto che, in assenza di stimoli di *stress*, JNK eserciti un’attività basale, mantenuta a livelli bassi a causa dell’associazione della

GSTP1-1 alla chinasi. L'esposizione di cellule a stimoli quali *stress* ossidativo, irradiazioni UV, o a taluni farmaci antitumorali, risulta provocare invece un aumento dell'attività di JNK, conseguente alla dissociazione e alla oligomerizzazione della GSTP1-1 (Figura 4) [Adler *et al.*, 1999; Laborde, 2010; Tew e Townsend, 2012]. Vi sono pareri contrastanti riguardo alla forma, se monomerica [Adler *et al.*, 1999] o dimerica [Wang *et al.*, 2001; Gildenhuis *et al.*, 2010], di GSTP1-1 interagente con JNK. L'interazione tra GSTP1-1 e JNK è stata studiata e riscontrata ugualmente *in vivo*, mediante l'utilizzo di topi transgenici, privi dei geni codificanti le GSTP murine [Elsby *et al.*, 2003]. E' stato osservato, inoltre, che anche la GSTA1-1 umana è in grado di associarsi con JNK e di inibirne l'attività *in vitro* [Romero *et al.*, 2006].

La GSTP1-1 risulta coinvolta ugualmente nella regolazione della via di segnalazione della citochina *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), mediante l'associazione con una proteina di tale *pathway*: il *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* (TRAF2). L'associazione di GSTP1-1 con TRAF2 inibisce l'interazione di TRAF2 con la MAP chinasi chinasi chinasi *apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), e la conseguente attivazione di ASK1 e della via di segnalazione cellulare in cui essa è coinvolta, che conduce ad apoptosi. In questa via di segnalazione rientra, e viene attivata, anche la suddetta JNK (Figura 4) [Wu *et al.*, 2006; Sau *et al.*, 2012]. E' stato scoperto, infine, che la forma GSTM1-1 è in grado di associarsi con ASK1 e di inibirne l'attività [Cho *et al.*, 2001; Dorion *et al.*, 2002].

#### *1.1.6. Sovraespressione nei tumori e ruolo nella resistenza a farmaci antitumorali*

Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato una correlazione positiva tra livelli di espressione di alcune GST solubili, in particolare di classe *Alpha*, *Mu* e *Pi*, e resistenza innata o acquisita a vari farmaci antitumorali. Elevati livelli di GSTP1-1 sono stati inoltre riscontrati in molti tessuti tumorali umani non trattati, confrontati con i corrispondenti tessuti non tumorali. Di conseguenza, un'elevata espressione di GST, specialmente di GSTP1-1, è considerata *marker* di sviluppo tumorale, ed è stata associata a resistenza ad agenti antitumorali [Hayes e Pulford, 1995; Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010; Sau *et al.*, 2010, e referenze ivi contenute].



**Figura 4. Modello dell'interazione di GSTP1-1 con JNK e TRAF2 e della modulazione delle vie di segnalazione cellulare in cui JNK e TRAF2 sono coinvolte.** In assenza di stimoli di *stress*, GSTP1-1 interagisce con JNK e TRAF2, mantenendo bassi i livelli di attività di JNK e inibendo l'interazione di TRAF2 con ASK1, evento che concorre anch'esso a mantenere bassa l'attività di JNK. La presenza di stimoli di *stress* o di TNF $\alpha$  provoca dissociazione di GSTP1-1 da JNK e TRAF2 e oligomerizzazione, con conseguente aumento dell'attività di JNK e fosforilazione, da parte di questa, di c-Jun, evento che conduce alla trascrizione di geni *target* coinvolti in processi cellulari quali apoptosi e proliferazione [modificata da Luo *et al.*, 2011].

Una serie di studi ha evidenziato anche un'interazione sinergica tra GST, in particolare GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1, e trasportatori di membrana MRP, responsabili dell'efflusso dalle cellule di coniugati con GSH, nel conferimento di resistenza ad alcuni farmaci antineoplastici [Sau *et al.*, 2010, e referenze ivi contenute].

In tabella 1 sono elencati esempi di agenti antitumorali verso i quali è stata osservata resistenza associata ad aumento dei livelli di GST; tali agenti includono sia composti substrato, sia non substrato, di reazioni di coniugazione al GSH mediate da GST. Elevati livelli di GST possono indurre resistenza nei confronti di farmaci substrato mediante coniugazione di questi farmaci con GSH e conseguente loro inattivazione. D'altro canto, le GST potrebbero conferire resistenza a farmaci non substrato mediante la regolazione dei *pathways* delle MAP chinasi (vedi "1.1.5. Funzioni non catalitiche"). Molti agenti antitumorali agiscono infatti inducendo apoptosi attraverso l'attivazione di tali vie di

segnalazione cellulare, e le GST, qualora sovraesprese, potrebbero ostacolarne l'azione mediante inibizione di proteine coinvolte in questi *pathways* apoptotici [Townsend e Tew, 2003; Ruzza *et al.*, 2009].

**Tabella 1. Farmaci antitumorali verso i quali è stata osservata resistenza associata ad aumento dei livelli di GST** [modificata da Ruzza *et al.*, 2009]

<i>Substrati di GST</i>	<i>Non substrati di GST</i>
Clorambucil Cisplatino Etoposide chinone (metabolita dell'Etoposide) Melfalan Mostarda fosforamidica (metabolita della Ciclofosfamide) Carmustina Tepa (metabolita del Tiotepa)	Adriamicina Bleomicina Mitomicina C Carboplatino

#### *1.1.7. GST quali bersagli molecolari nel trattamento dei tumori umani*

Alla luce di quanto detto sinora, le GST, in particolare la GSTP1-1, risultano un promettente bersaglio molecolare per il trattamento dei tumori umani non responsivi agli agenti antitumorali attualmente disponibili. Diversi approcci terapeutici in cui le GST costituiscono il *target* farmacologico sono potenzialmente adottabili. Un primo approccio potrebbe essere rappresentato dall'impiego di inibitori dell'attività coniugativa delle GST, in cosomministrazione con farmaci antineoplastici convenzionali inattivati mediante coniugazione con GSH, al fine di aumentare l'efficacia di questi ultimi. D'altro canto, si potrebbe pensare di utilizzare, anche in monoterapia, composti capaci di dissociare i complessi tra GST e membri dei *pathways* delle MAP chinasi, così da promuovere l'apoptosi. Infine, si potrebbe trarre vantaggio dalla sovraespressione della GSTP1-1 nei tumori umani, avvalendosi di profarmaci substrato di tale enzima e metabolizzati da questo in prodotti citotossici [Ruzza *et al.*, 2009].

Nel corso degli anni sono stati preparati e studiati numerosi inibitori di GST o profarmaci attivati da tali enzimi, alcuni dei quali sono ad oggi in fase avanzata di valutazione preclinica o in fase di valutazione clinica.

## 1.2. Inibitori di GST e profarmaci attivati via GST

### 1.2.1. Inibitori di GST

Tra i primi inibitori di GST ad essere stati disegnati e sintetizzati si annoverano numerosi coniugati del GSH, ossia composti organici rispondenti alla formula generale GS-R. Ciò che ha ispirato la preparazione di questi inibitori è stata l'osservazione della suscettibilità delle GST all'inibizione da prodotto di reazione. Un esempio di tali composti è l'*S*-etil glutatione, la cui formula di struttura è riportata in Figura 5. Sebbene si siano dimostrati degli efficaci inibitori dell'attività coniugativa di GST *in vitro*, i coniugati del GSH non si prestano all'utilizzo clinico, in quanto privi di selettività nei confronti di una specifica forma di GST, e instabili *in vivo* poiché suscettibili di idrolisi da parte degli enzimi responsabili del catabolismo del GSH e dei suoi coniugati, *in primis* la  $\gamma$ -GT [Burg e Mulder, 2002; Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010, e referenze ivi contenute].

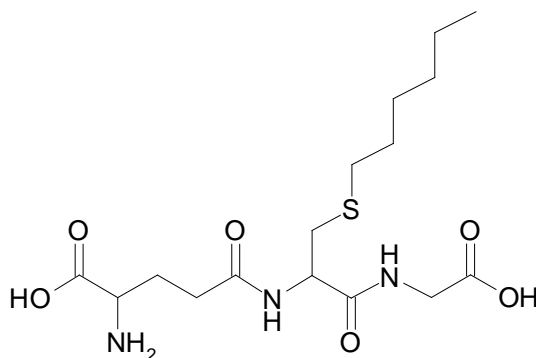


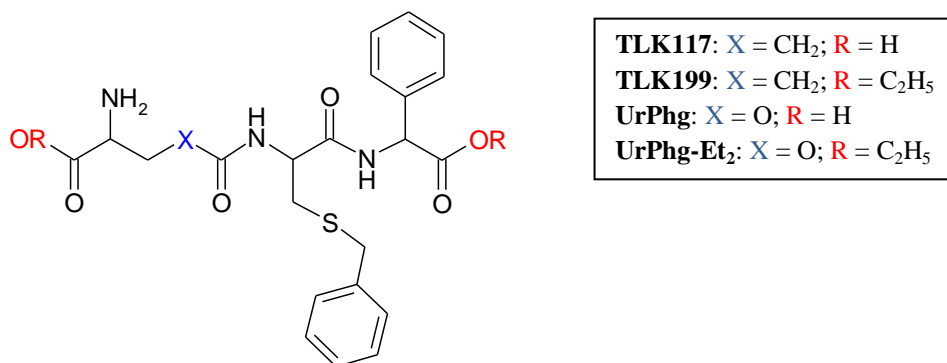
Figura 5. Formula di struttura dell'*S*-etil glutatione

Sulla base di tali osservazioni, e considerata l'elevata affinità delle GST per il GSH, le successive ricerche si sono indirizzate all'ottenimento di nuovi inibitori competitivi aventi la struttura di analoghi (peptidici o non peptidici) del GSH, caratterizzati da stabilità all'azione delle  $\gamma$ -GT ed eventuale selettività d'azione. Tali ricerche hanno evidenziato come la porzione  $\gamma$ -glutammilica del GSH sia assolutamente essenziale ai fini dell'attività biologica (interazione con il sito G), mentre modifiche nei residui di glicina e di cisteina siano tollerate, purché vengano mantenute carica e idrofobicità appropriate [Burg e Mulder, 2002; Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010, e referenze ivi contenute].

Tra i numerosi analoghi del GSH preparati nel corso degli anni, merita di essere citato il composto chiamato “TLK117” (Figura 6), caratterizzato dalla presenza di un gruppo benzilico legato all’atomo di zolfo della cisteina e dalla sostituzione del residuo di glicina con l’ $\alpha$ -fenilglicina. Tale composto si è rivelato un inibitore potente e relativamente selettivo della GSTP1-1 umana [costante di inibizione ( $K_i$ ) pari a 0,42  $\mu$ M] [Lyttle *et al.*, 1994a]. Il TLK117, tuttavia, analogamente al GSH, non è in grado di diffondere facilmente attraverso la membrana cellulare, in quanto caratterizzato dalla presenza di gruppi funzionali ionizzati al pH fisiologico. Per ovviare a questo problema, è stato preparato il profarmaco estere dietilico del TLK117, chiamato “TLK199” (Figura 6), il quale, dopo rapido *uptake* cellulare, rilascia all’interno della cellula il TLK117 per idrolisi mediata da esterasi. Il TLK199 si è dimostrato capace di sensibilizzare *in vitro* varie cellule tumorali umane all’agente alchilante clorambucil, e di aumentare l’efficacia dell’antitumorale melfalan *in vivo* in un modello di tumore del colon umano caratterizzato da sovraespressione di GSTP1-1 [Morgan *et al.*, 1996]. Inoltre, inaspettatamente, studi preclinici condotti nel topo hanno rivelato come il composto in analisi promuova la crescita e la maturazione delle cellule staminali emopoietiche del midollo osseo. Tale effetto può essere spiegato con la capacità del farmaco di facilitare la dissociazione della GSTP1-1 da JNK e di attivare il *pathway* della chinasi, il quale conduce a crescita e a differenziazione cellulare. In cellule leucemiche umane, invece, l’attivazione dello stesso *pathway* da parte del TLK199 conduce a morte cellulare per apoptosi. Considerato ciò, il TLK199 (Telintra<sup>®</sup>, Ezatiostat cloridrato) è attualmente in fase avanzata di valutazione clinica per il trattamento della sindrome mielodisplastica, disordine proliferativo clonale delle cellule emopoietiche del midollo osseo che può progredire a leucemia mieloide acuta [Raza *et al.*, 2012; Ruzza *et al.*, 2009; Laborde, 2010, e referenze ivi contenute].

Un altro analogo del GSH degno di nota è il composto chiamato “UrPhg” (Figura 6), caratterizzato, come il TLK117, dalla presenza di un gruppo benzilico legato all’atomo di zolfo della cisteina e dalla sostituzione del residuo di glicina con l’ $\alpha$ -fenilglicina, ma, in aggiunta, anche dalla sostituzione del legame peptidico tra  $\gamma$ -glutammato e cisteina con un gruppo carbammato, al fine di aumentare la stabilità alle  $\gamma$ -GT. Anche nel caso dell’UrPhg, al fine di facilitare l’*uptake* cellulare è stato sintetizzato il profarmaco estere dietilico (UrPhg-Et<sub>2</sub>, Figura 6). L’UrPhg si è rivelato un inibitore potente e selettivo della GSTP1-1 ( $K_i$  pari a 29, 16 e 3  $\mu$ M nei confronti rispettivamente delle GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1). Studi *in vitro*

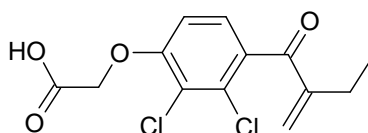
hanno dimostrato come l'UrPhg-Et<sub>2</sub> provochi inoltre l'oligomerizzazione di GSTP1-1 e l'attivazione di JNK [Burg *et al.*, 2006].



**Figura 6.** Formula di struttura degli analoghi del GSH TLK117, TLK199, UrPhg e UrPhg-Et<sub>2</sub>

Gli inibitori di GST fin qui descritti sono composti la cui struttura richiama quella del GSH, e il cui meccanismo di inibizione è di tipo reversibile competitivo al sito G delle GST. Altri composti ottenuti mediante sintesi e capaci di inibire l'attività di GST, d'altro canto, non simulano la struttura del GSH, ma presentano natura chimica varia, e interagiscono con siti differenti dal sito G.

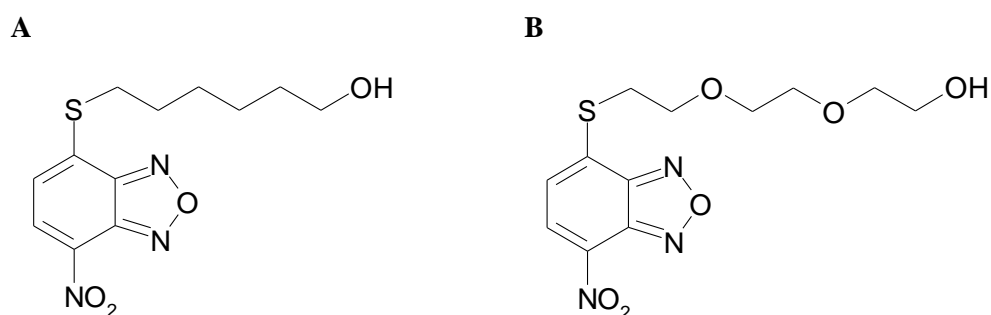
A questa categoria di inibitori di GST appartiene l'acido etacrinico (*etachrynic acid*, EA) (Figura 7), farmaco registrato per l'uso clinico come diuretico. Studi in vitro hanno dimostrato come l'EA inibisca l'attività coniugativa di enzimi GST delle classi *Alpha*, *Mu* e *Pi* legandosi covalentemente al sito H; tale molecola è inoltre riconosciuta come substrato dalle GST, e ne inibisce l'attività anche in forma di coniugato con il GSH (inibizione da prodotto). L'EA si è dimostrato in grado di potenziare gli effetti tossici del clorambucil in linee cellulari umane di carcinoma del colon, e di aumentare l'efficacia dell'antitumorale melfalan in topi portatori di tumore del colon umano. Tuttavia, l'utilizzo dell'EA quale chemiosensibilizzante nella pratica clinica è limitato dalle sue proprietà diuretiche e dalla mancanza di selettività d'azione [Ruzza *et al.*, 2009; Sau *et al.*, 2010, e referenze ivi contenute].



**Figura 7.** Formula di struttura dell'EA



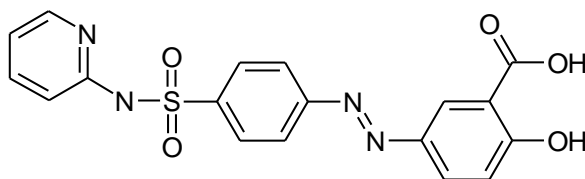
Fra gli inibitori di GST non peptidomimetici si annoverano i composti derivati dal 7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo (NBD), disegnati, sintetizzati e studiati prevalentemente dal gruppo di ricerca della Prof.ssa A. M. Caccuri (Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università di Roma “Tor Vergata”) [Ricci *et al.*, 2005; Sau *et al.*, 2010]. Due di essi, ossia il 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esanol (NBDHEX) e il suo analogo strutturale denominato “MC3181” (Figura 8), sono in fase avanzata di valutazione preclinica quali farmaci antitumorali, oltre che oggetto del presente lavoro di tesi. Per una più ampia trattazione delle caratteristiche dei due composti si veda il paragrafo 1.4.



**Figura 8. Formula di struttura dell’NBDHEX (A) e del suo analogo strutturale MC3181 (B)**

Studi *in vitro* hanno dimostrato come anche il farmaco sulfasalazina (salicilazosulfapiridina, SASP, Figura 9), attualmente in uso in Europa e negli Stati Uniti nel trattamento di malattie infiammatorie intestinali croniche e dell’artrite reumatoide [Peppercorn, 1984; Plosker e Croom, 2005], sia un inibitore dell’attività catalitica coniugativa di alcune forme di GST [Ahmad *et al.*, 1992; Awasthi *et al.*, 1994; Hayeshi *et al.*, 2006].

Così come l’NBDHEX e l’MC3181, anche la SASP è oggetto del lavoro di ricerca descritto nel presente elaborato di tesi; per una descrizione più approfondita delle sue caratteristiche si veda il paragrafo 1.3.

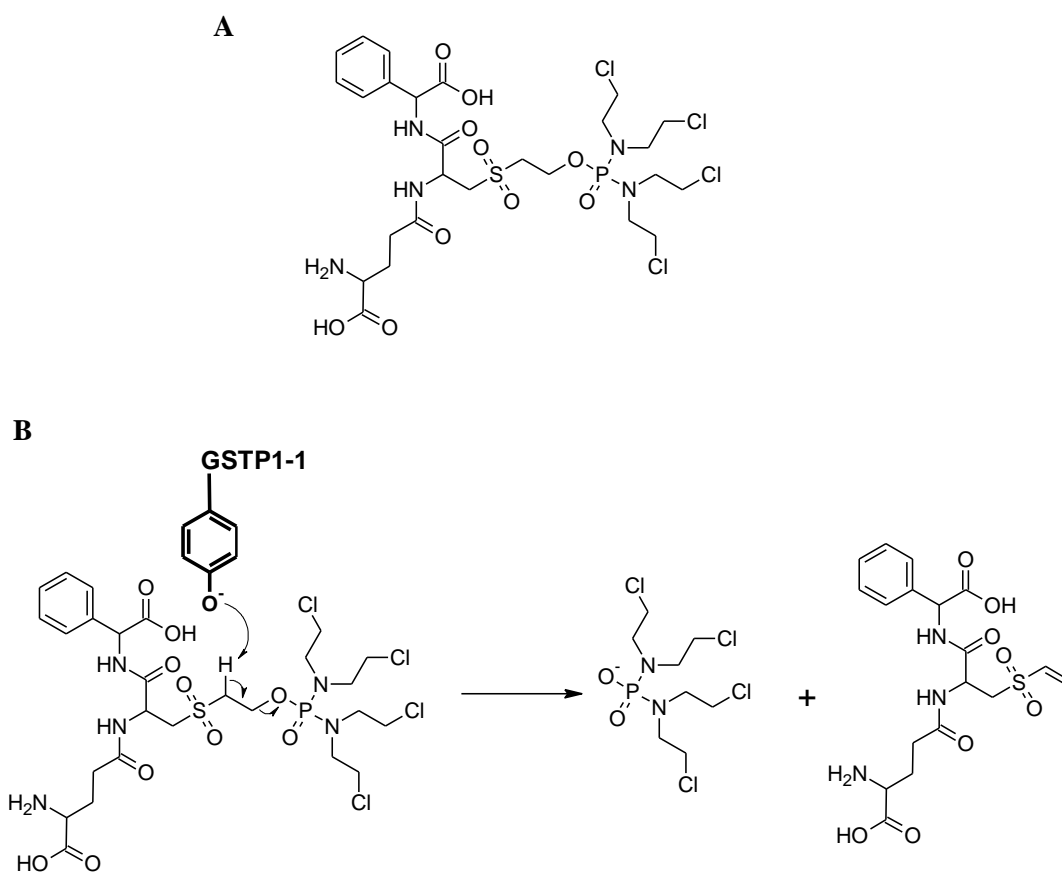


**Figura 9. Formula di struttura della SASP**

Vorrei ricordare infine che, oltre a composti ottenuti per sintesi, come quelli sino ad ora citati, anche sostanze di origine naturale hanno mostrato attività inibitoria nei confronti di alcune GST. Fra di esse si annoverano diverse forme di vitamina E e vari polifenoli tra cui alcuni flavonoidi (quali la quercetina e la galangina), la curcumina (polifenolo estratto dal rizoma della pianta *Curcuma longa* L.) e il gossipolo (polifenolo derivato dai semi della pianta del cotone). In particolare, la quercetina e la curcumina sembrano inibire l'attività della GSTP1-1 mediante modificazione covalente del residuo Cys47 della proteina [Ruzza *et al.*, 2009].

### 1.2.2. Profarmaci attivati via GST

Tra i profarmaci attivati via GST progettati, sintetizzati e studiati nel corso degli anni, un primo gruppo è costituito da sostanze che, in seguito a scissione mediata da GST, rilasciano agenti alchilanti. Un esempio in tal senso è quello offerto dal composto denominato “TLK286” (Telcyta<sup>®</sup>, Canfosfamide), ottenuto dal legame, mediante un gruppo solfonico, dell'agente alchilante tetrakis (cloroetil) fosforodiamidato a un analogo strutturale del GSH, quest'ultimo capace di interagire con il sito G (Figura 10A). Il meccanismo proposto di attivazione del TLK286 da parte di GST si basa sulla capacità degli enzimi GST di sottrarre un protone al carbonio  $\alpha$  adiacente al gruppo solfonico della molecola, con successiva  $\beta$ -eliminazione dell'agente alchilante (Figura 10B). Nella sottrazione del protone al carbonio  $\alpha$  adiacente al gruppo solfonico interviene, in particolare, il residuo di tirosina del sito G delle GST rivelatosi responsabile della formazione dell'anione GS<sup>-</sup> nel meccanismo catalitico di tali enzimi (vedi “1.1.3. Struttura e meccanismo catalitico”) [Lyttle *et al.*, 1994b]. Studi *in vitro* basati sull'utilizzo di GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1 umane ricombinanti hanno dimostrato come il TLK286 sia attivato dalle forme GSTA1-1 e GSTP1-1. Il TLK286 ha mostrato citotossicità nei confronti di linee cellulari tumorali e attività antitumorale in modelli murini di tumore umano, entrambe positivamente correlate con i livelli di espressione di GSTP1-1. Il farmaco si è rivelato infine efficace nei confronti di diversi tumori in studi clinici di fase II, sia come singolo agente, sia in combinazione con altri chemioterapici [Lyttle *et al.*, 1994b; Morgan *et al.*, 1998; Ruzza *et al.*, 2009; vedi [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)].

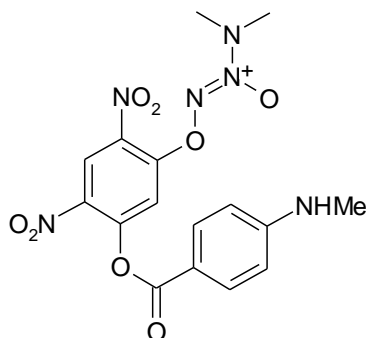


**Figura 10. Formula di struttura del TLK286 (A) e meccanismo proposto per la sua attivazione da parte della GSTP1-1 (B)** [tratta da Ruzza *et al.*, 2009]

Altri profarmaci attivati da GST ad agenti alchilanti danno origine a tali agenti non in seguito a scissione mediata direttamente dalla proteina, bensì in seguito alla loro coniugazione con GSH catalizzata da GST. Fra di essi si annovera la brostallicina, composto attualmente soggetto a studi clinici di fase I e II [Sau *et al.*, 2010, e referenze ivi contenute].

Una differente categoria di profarmaci attivati via GST include molecole rilascianti livelli citotossici di ossido nitrico (NO). Tali profarmaci reagiscono con tioli cellulari, tra cui il GSH, mediante reazione spontanea o mediata da GST, generando specie chimiche che, successivamente, si decompongono spontaneamente liberando NO. Un esempio in tal senso è quello offerto dal O<sup>2</sup>-(2,4-dinitro-5-(N-metil-N-4-carbossifenilamino)fenil]-N,N-dimetilamino)-1-diazonio-1,2-diolato (PABA/NO), la cui struttura è riportata in Figura 11. Il PABA/NO ha mostrato citotossicità *in vitro* e attività antitumorale *in vivo*, in topi immunodepressi portatori di carcinoma ovarico umano. Tuttavia, il composto in

analisi presenta alcuni limiti, come la ridotta idrosolubilità e la rapida idrolisi spontanea [Findlay *et al.*, 2004; Ruzza *et al.*, 2009; Sau *et al.*, 2010].



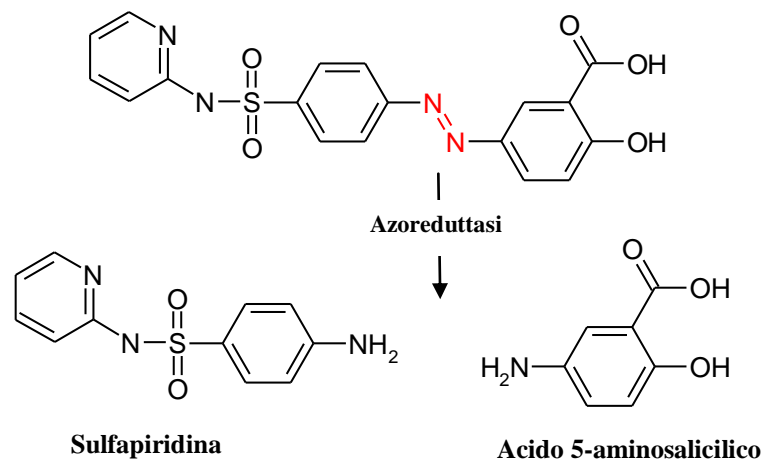
**Figura 11. Formula di struttura del PABA/NO**

Infine, un'ulteriore gruppo di profarmaci attivati per azione di GST è costituito da molecole rilascianti il citotossico 6-mercaptopurina in seguito a reazione con il GSH, spontanea o catalizzata da GST [Ruzza *et al.*, 2009].

### **1.3. La sulfasalazina (SASP) e i suoi analoghi strutturali**

La SASP [Azulfidine<sup>®</sup>; Salazopyrin<sup>®</sup>] è un farmaco attualmente in uso per il trattamento di alcune malattie infiammatorie intestinali croniche, quali la colite ulcerosa e il morbo di Crohn [Peppercorn, 1984], e dell'artrite reumatoide [Plosker e Croom, 2005].

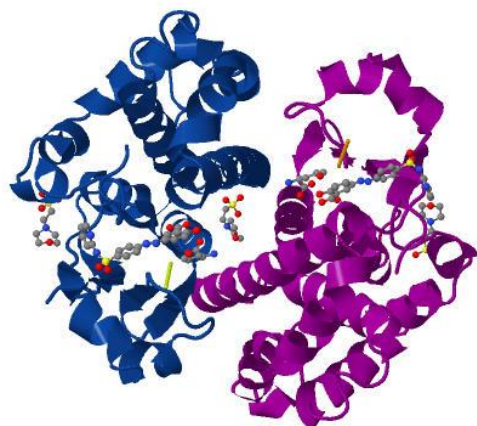
La SASP è costituita da una porzione sulfonamidica, rappresentata dall'antibatterico sulfapiridina (SP), legata, con legame azoico, all'acido 5-aminosalicilico (5-ASA), composto dotato di attività antinfiammatoria (Figura 12). E' stato proposto che, in seguito a somministrazione orale, la SASP venga solo in piccola parte assorbita a livello dell'intestino tenue, e che la maggior parte di essa raggiunga il colon. Qui il farmaco verrebbe scisso a livello del legame azoico nei due componenti SP e 5-ASA ad opera di azoreduttasi batteriche (Figura 12); a livello del colon il 5-ASA eserciterebbe dunque la sua funzione antinfiammatoria. Nell'uomo, la percentuale di SASP che dopo somministrazione orale raggiunge intatta la circolazione sistemica (biodisponibilità assoluta) è inferiore al 15 % [Klotz, 1985].



**Figura 12.** Scissione della SASP a livello del legame azoico ad opera di azoreduttasi e formazione dei due metaboliti sulfapiridina e acido 5-aminosalicilico

Più recentemente è stato dimostrato che lo scarso assorbimento della SASP in forma immodificata è dovuto principalmente all'attività dei trasportatori di efflusso *breast cancer resistance protein* (BCRP) e MRP2 espressi sulla membrana apicale (luminale) delle cellule dell'epitelio dell'intestino tenue [Dahan e Amidon, 2009; Tomaru *et al.*, 2013].

Come accennato in precedenza, studi *in vitro* basati sull'impiego del substrato *marker* CDNB (Figura 2), hanno dimostrato come la SASP, a differenza dei suoi metaboliti SP e 5-ASA, sia un inibitore reversibile relativamente potente ( $IC_{50}$  nel range  $\mu M$ ) dell'attività coniugativa delle GST di classe *Alpha*, *Mu* e *Pi* estratte da tessuti umani. In particolare, rispetto al substrato elettrofilo CDNB, è stata osservata un'inibizione di tipo non competitivo nei confronti della GST umana di classe *Alpha*, misto nei confronti della GST di classe *Mu*, e competitivo nei confronti della GST di classe *Pi* [Ahmad *et al.*, 1992; Oakley *et al.*, 1999]. Dati cristallografici relativi al complesso della GSTP1-1 con SASP e GSH (Figura 13), supportano i risultati dei suddetti esperimenti di cinetica enzimatica, indicando un'interazione della SASP con il sito di legame dell'elettrofilo (sito H) [Oakley *et al.*, 1999]. La SASP si è inoltre dimostrata in grado di inibire l'attività GST e di potenziare l'attività del cisplatino in due linee cellulari umane di tumore polmonare [Awasthi *et al.*, 1994].



**Figura 13. Struttura tridimensionale della GSTP1-1 complessata con i substrati GSH e SASP**  
[tratta da: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=13GS&=1>]

Data la sua scarsa biodisponibilità orale e la sua ridotta selettività d'azione, la SASP si mostra poco adatta a un possibile uso *in vivo* quale inibitore di GST per la terapia dei tumori. Alla luce di tale considerazione, e vista la disponibilità dei dati cristallografici relativi al complesso inibitore-enzima [Oakley *et al.*, 1999], di recente è stato avviato un progetto di ricerca con l'obiettivo di disegnare, sintetizzare e valutare l'attività biologica di nuovi analoghi strutturali della SASP quali potenziali inibitori di GSTP1-1 per la terapia dei tumori. In particolare, si vogliono identificare composti caratterizzati da stabilità alle azoreduttasi e potenzialmente da una maggior attività inibitoria nei confronti della GSTP1-1 rispetto alla molecola di origine. Tale progetto vede la partecipazione dei gruppi di ricerca diretti dal Dott. L. Quintieri e dal Prof. S. Moro (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova), e dalla Prof.ssa S. Castellano (Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Salerno).

I nuovi analoghi strutturali della SASP, sintetizzati nel laboratorio diretto dalla Prof.ssa Castellano, si caratterizzano tutti per la sostituzione del legame azoico con un anello imidazolico (derivati benzimidazolici) al fine di conferire stabilità alle azoreduttasi. Ulteriori modifiche sono state apportate a carico della porzione sulfonamidica e/o della porzione aminosalicilica della SASP. A titolo di esempio, in Figura 14 è riportata la formula di struttura di uno di tali analoghi strutturali della SASP, ottenuto dalla molecola di origine per sola sostituzione del legame azoico con un anello imidazolico, e denominato "EML258". Le formule di struttura di tutti i derivati benzimidazolici sintetizzati sono rappresentate invece in Figura 32, nel capitolo "Risultati e discussione".

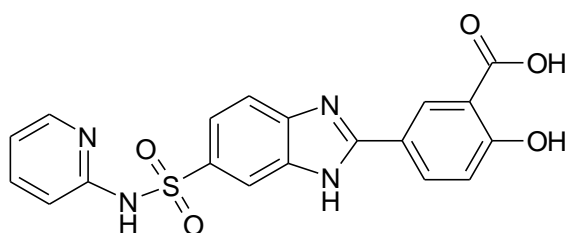
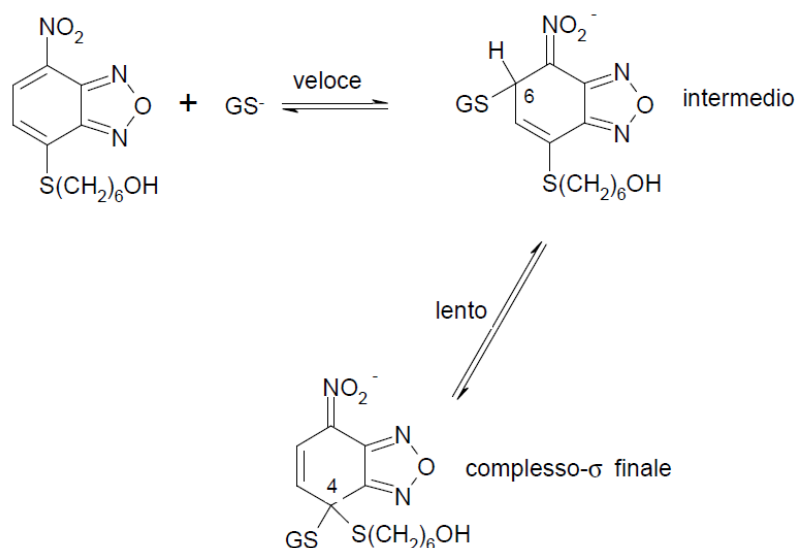


Figura 14. Formula di struttura dell'analogo strutturale della SASP "EML258"

#### 1.4. Il 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esanolo (NBDHEX) e il suo analogo strutturale MC3181

Come già accennato, nella speranza di identificare nuovi inibitori non peptidomimetici della GSTP1-1 caratterizzati da elevata capacità di penetrazione all'interno della cellula, e non estrusi da parte di trasportatori di efflusso, il gruppo di ricerca diretto dalla Prof.ssa A. M. Caccuri ha, verso la metà degli anni '90, progettato e sintetizzato, a partire dal 4-cloro-7-nitrobenzofurazano, una piccola serie di derivati dell'NBD [Caccuri *et al.*, 1996; Ricci *et al.*, 2005]. Quattro dei cinque composti preparati si sono dimostrati potenti inibitori *in vitro* dell'attività coniugativa delle GST A1-1, M2-2 e P1-1 umane. In particolare, uno di essi, l'NBDHEX, ottenuto per sostituzione del cloro in posizione 4 del 4-cloro-7-nitrobenzofurazano con una catena alifatica mercaptoesanolica (Figura 8A), si è rivelato il composto più interessante, in quanto dotato di più elevata potenza inibitoria nei confronti della GSTP1-1. L'NBDHEX dimostra selettività d'azione nei confronti della GSTM2-2 ( $IC_{50} \leq 0,01 \mu M$ ) e, in misura minore, nei confronti della GSTP1-1 ( $IC_{50}$  pari a circa  $0,8 \mu M$ ), piuttosto che nei confronti della GSTA1-1 ( $IC_{50}$  pari a circa  $25 \mu M$ ) [Ricci *et al.*, 2005].

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione dell'NBDHEX, è stato proposto che esso agisca da *mechanism-based inhibitor* di GST. Esso si lega infatti al sito H delle GST, dove subisce l'attacco nucleofilo da parte del GSH in corrispondenza del C4 dell'anello benzossadiazolico, formando un intermedio di reazione (definito "complesso  $\sigma$ " o complesso di Meisenheimer) che risulta stabilizzato nel sito attivo dell'enzima da parte di entrambi i siti di legame (G ed H) e si ritiene costituisca la vera specie inibente l'attività catalitica. Il meccanismo proposto di formazione del complesso  $\sigma$  nel sito attivo della GSTP1-1 è riportato in Figura 15 [Ricci *et al.*, 2005; Federici *et al.*, 2009].



**Figura 15. Meccanismo di formazione del complesso  $\sigma$  nel sito attivo della GSTP1-1:** rapida formazione di un pre-complesso con lo zolfo del GSH legato al C6 del benzossadiazolo dell’NBDHEX, quindi lenta evoluzione verso il complesso  $\sigma$  finale con lo zolfo legato al C4 del benzossadiazolo [modificata da Federici *et al.*, 2009].

Numerosi studi hanno dimostrato come l’NBDHEX eserciti un effetto citostatico e citotossico nei confronti di varie linee cellulari tumorali, tra cui linee resistenti ad agenti antitumorali convenzionali. E’ interessante notare come i valori di  $\text{IC}_{50}$  osservati in tali studi siano dello stesso ordine di grandezza (nel *range* basso  $\mu\text{M}$ ) del valore di  $\text{IC}_{50}$  ottenuto nei confronti della GSTP1-1 nei suddetti saggi di inibizione enzimatica *in vitro*; ciò suggerisce che il bersaglio intracellulare della molecola in esame sia la GSTP1-1 [Ricci *et al.*, 2005; Turella *et al.*, 2005; Pellizzari Tregno *et al.*, 2009; Pasello *et al.*, 2011; De Luca *et al.*, 2013]. Analisi riguardanti il meccanismo di morte cellulare indotta da NBDHEX hanno evidenziato come il composto, legandosi alla GSTP1-1, provochi la dissociazione dell’enzima dalla chinasi JNK, con conseguente attivazione del *pathway* apoptotico controllato da tale chinasi (vedi “1.1.5. Funzioni non catalitiche”) [Turella *et al.*, 2005; Sau *et al.*, 2012]. L’NBDHEX ha mostrato efficacia anche in linee cellulari tumorali sovraesprimenti trasportatori di membrana ABC, quali la glicoproteina P e la MRP1 [Turella *et al.*, 2006; Filomeni *et al.*, 2008; Ascione *et al.*, 2009].

Infine, l’NBDHEX ha manifestato attività antitumorale anche in studi *in vivo*, in diversi modelli murini di tumore umano, a dosi non tossiche per l’ospite [Pellizzari Tregno *et al.*, 2009; Pasello *et al.*, 2011].



L'NBDHEX è un composto a basso peso molecolare (P.M. pari a 297 Da) e dalla elevata lipofilia, caratteristiche che ne facilitano l'attraversamento della membrana cellulare e l'ingresso nelle cellule. D'altro canto, però, la scarsa idrosolubilità ne può limitare la biodisponibilità orale e ne ostacola la somministrazione per via parenterale. Considerato questo, il gruppo di ricerca della Prof.ssa Caccuri ha progettato e sintetizzato alcuni analoghi strutturali dell'NBDHEX caratterizzati da una maggior idrosolubilità. Tra di essi si annovera l'MC3181, il quale si differenzia dall'NBDHEX per la presenza di due atomi di ossigeno inseriti nel contesto della catena idrossiesilica laterale (Figura 8B).

Saggi di inibizione enzimatica *in vitro* hanno dimostrato come anche l'MC3181 sia un inibitore potente dell'attività coniugativa delle GSTM2-2 e GSTP1-1 umane ( $IC_{50}$  pari rispettivamente a circa 0,081 e 2,6  $\mu$ M), e come, rispetto all'NBDHEX, esso esibisca maggiore selettività d'azione nei confronti della GSTP1-1. L'MC3181 ha mostrato attività antitumorale in un pannello di linee cellulari di melanoma umano, con valori di  $IC_{50}$  nel range del basso  $\mu$ M. Infine, il composto risulta efficace anche *in vivo*, in modelli murini di melanoma umano, in seguito a somministrazione orale o endovenosa di dosi non tossiche per l'animale [De Luca *et al.*, 2014].

Considerate le caratteristiche fin qui descritte, l'NBDHEX e l'MC3181 appaiono dei promettenti agenti per la terapia dei tumori umani. Ad oggi, come in parte descritto sopra, sono in corso studi relativi all'efficacia, alla tossicità e alla farmacocinetica dei due composti, ma sono del tutto assenti informazioni circa la loro stabilità metabolica. Quest'ultimo aspetto è importante nello sviluppo di un nuovo candidato farmaco, dal momento che la biotrasformazione di una sostanza può condizionarne non solo la biodisponibilità, ma anche i profili di attività biologica e di tossicità, così come può renderne possibile un'interazione con altri farmaci eventualmente cosomministrati (vedi "1.5.3. Gli studi di biotrasformazione dei farmaci").

## **1.5. La biotrasformazione degli xenobiotici**

### *1.5.1. Generalità e importanza della biotrasformazione degli xenobiotici*

Tutti gli organismi viventi sono costantemente esposti a sostanze esogene di varia natura (ad esempio inquinanti di origine antropogenica e tossine naturali) dette xenobiotici; fra di esse si annoverano anche la maggior parte delle sostanze

utilizzate, nell'uomo, nella terapia, nella profilassi e nella diagnosi delle malattie, ossia i farmaci. Gli xenobiotici sono generalmente composti lipofili, da un lato facilmente assorbiti attraverso gli epitelii dell'organismo, dall'altro difficilmente eliminabili dall'organismo stesso, in quanto suscettibili di un facile riassorbimento. Per evitare il loro accumulo e poter essere allontanate dall'organismo, tali sostanze vengono dunque trasformate in composti più polari, in un processo noto come metabolismo o biotrasformazione degli xenobiotici. Nei vertebrati, la biotrasformazione degli xenobiotici è operata da specifici enzimi localizzati in diversi compartimenti subcellulari, principalmente nelle membrane del reticolo endoplasmatico liscio (struttura che, in seguito ad omogeneizzazione di un tessuto, si riorganizza in vescicole definite "microsomi") e nel citosol. Reazioni di metabolismo si realizzano anche in altri siti tra cui in particolare i mitocondri, i lisosomi e i fluidi extracellulari. Nei mammiferi, il fegato rappresenta la sede principale della biotrasformazione degli xenobiotici, ma numerosi enzimi metabolizzanti gli xenobiotici sono presenti anche in altri tessuti e organi, in particolare l'intestino tenue e in misura minore polmone, rene, cute e cervello, oltre che nel plasma e nelle secrezioni digestive [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

La biotrasformazione di uno xenobiotico conduce generalmente alla formazione di uno o più prodotti, detti metaboliti, privi di attività biologica o aventi minor attività rispetto al composto di origine; esistono tuttavia anche casi in cui il metabolismo di una sostanza genera uno o più prodotti dotati di attività biologica e/o tossicità, simili o differenti da quelle della molecola da cui derivano. Infine, alcuni tipi di composti non possiedono o presentano scarsa attività biologica, ma vengono biotrasformati nell'organismo in uno o più metaboliti attivi che rappresentano i veri mediatori dell'attività della sostanza somministrata; ne costituiscono un esempio i profarmaci [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

#### *1.5.2. Variabilità legata al sesso e variabilità interspecie*

E' noto che può esistere una certa variabilità interindividuale nella biotrasformazione di un determinato xenobiotico, con conseguente variabilità nella sua attività biologica. Tale variabilità può dipendere da vari fattori, legati all'individuo e ambientali, quali ad esempio polimorfismi nei geni codificanti enzimi di biotrasformazione, ed esposizione a induttori o inibitori enzimatici. La biotrasformazione di uno xenobiotico può risultare variabile, sia in termini

qualitativi sia in termini quantitativi, anche in funzione del sesso dell'individuo. Ciò è dovuto a profili di secrezione ormonale (quale il profilo di secrezione dell'ormone della crescita) e alla produzione di ormoni sessuali diversi nei due sessi, che si traducono in una differente regolazione dell'espressione genica di enzimi di biotrasformazione [Shapiro *et al.*, 1995; Mugford e Kedderis, 1998; Waxman e Holloway, 2009; Parkinson e Ogilvie, 2010]. Diversi studi relativi alla biotrasformazione di xenobiotici nell'uomo e nelle specie di animali da laboratorio più comunemente utilizzate nella ricerca biomedica, hanno evidenziato come una variabilità legata al sesso sia marcata soprattutto nel ratto, in maniera particolare per quanto riguarda il metabolismo epatico. In tale organismo si osserva in generale una maggior velocità di biotrasformazione degli xenobiotici negli individui di sesso maschile piuttosto che negli individui di sesso femminile. Differenze nella biotrasformazione degli xenobiotici sono state riscontrate anche nel topo, ma esse sono decisamente meno marcate rispetto alle differenze osservate nel ratto. Inoltre, diversamente dal ratto, nel caso del topo gli individui di sesso maschile non sempre mostrano una velocità di biotrasformazione degli xenobiotici maggiore rispetto agli individui di sesso femminile, ma si può verificare anche il contrario, a seconda del ceppo murino in analisi. Nell'uomo, differenze legate al sesso nella biotrasformazione di xenobiotici sono, generalmente, poco marcate [Mugford e Kedderis, 1998; Waxman e Holloway, 2009].

Differenze nel metabolismo degli xenobiotici esistono inoltre tra specie diverse, come si può dedurre anche da quanto appena descritto. Sono state osservate differenze significative sia di tipo qualitativo che di tipo quantitativo tra l'uomo e diverse specie animali, comprese il ratto e il topo. Tali differenze interspecie riguardano anche i processi di induzione o inibizione degli enzimi di biotrasformazione [Lin, 1995; Lin e Lu, 1997; Parkinson e Ogilvie, 2010].

### *1.5.3. Gli studi di biotrasformazione dei farmaci*

Nella fase di sviluppo di un nuovo candidato farmaco, lo studio di quale sia il suo destino metabolico nell'organismo umano riveste particolare importanza. La biotrasformazione di una sostanza infatti, come sopra descritto, può influenzarne i profili di efficacia e/o tossicità; è inoltre noto come molte interazioni tra farmaci si verifichino in fase di biotrasformazione. E' quindi quanto mai essenziale conoscere se un nuovo candidato farmaco sia soggetto a metabolismo nell'organismo, quali siano gli enzimi coinvolti, e se gli eventuali metaboliti

prodotti possiedano attività biologica, concorrendo quindi a definire il profilo complessivo di efficacia terapeutica e tossicità del candidato stesso. In particolare, l'identificazione degli enzimi coinvolti nel metabolismo di un farmaco può essere utile per predire eventuali differenze interindividuali legate a polimorfismi genetici, e/o per prevedere possibili interazioni (in fase di biotrasformazione) con altri agenti terapeutici cosomministrati [Lin e Lu, 1997; Tingle e Helsby, 2006]. In passato lo studio preclinico della biotrasformazione di un candidato farmaco veniva tipicamente effettuato ricorrendo ad esperimenti *in vivo*, condotti in animali da laboratorio (in particolare il ratto e il cane) eventualmente corroborati da ulteriori indagini *in vitro* basate sull'impiego di frazioni subcellulari epatiche isolate dalle stesse specie di animali utilizzate negli studi *in vivo*. Tuttavia, come sopra riportato, possono esistere sensibili differenze interspecie nella biotrasformazione di uno xenobiotico, e ciò che viene osservato in studi condotti in animali da laboratorio non sempre riflette ciò che accade nell'organismo umano. Ecco quindi che, attualmente, lo studio preclinico del metabolismo di un candidato farmaco prevede anche l'esecuzione di esperimenti *in vitro*, basati sull'impiego di materiali di origine umana quali frazioni subcellulari (*in primis* epatiche), epatociti in coltura, enzimi ricombinanti, o ancora, fettine di tessuto (es. fettine di fegato). Gli studi di biotrasformazione *in vitro* sono tipicamente effettuati anche con materiale ottenuto da animali da laboratorio di sesso o di specie diverse, al fine di analizzare la potenziale variabilità legata al sesso e/o alla specie (vedi sopra). I risultati di studi comparativi tra specie *in vitro* possono infatti consentire di identificare la specie animale, tra quelle comunemente utilizzate in laboratorio nella ricerca biomedica, più idonea ai successivi studi preclinici di efficacia e tossicità del farmaco, ovvero la specie animale più simile all'uomo per quanto concerne il profilo metabolico del composto in esame. Tali studi possono altresì consentire un'analisi più consapevole di risultati già ottenuti in studi preclinici *in vivo* [Wrighton, 1995; Lin e Lu, 1997; Tingle e Helsby, 2006].

#### 1.5.4. Classificazione delle reazioni di biotrasformazione

Le reazioni di biotrasformazione sono convenzionalmente classificate in reazioni di fase I (o reazioni di funzionalizzazione) e reazioni di fase II (o reazioni di coniugazione). Le reazioni di fase I includono reazioni di ossidazione, di riduzione e di idrolisi, e consistono nell'introduzione o nell'esposizione, all'interno della molecola del substrato, di gruppi funzionali quali gruppi

ossidrili, amminici, tiolici o carbossilici, con conseguente lieve aumento della polarità della molecola. Le reazioni di fase II consistono invece nella coniugazione di gruppi funzionali presenti nei substrati (spesso metaboliti derivati da reazioni di fase I) con composti endogeni, quali ad esempio acido glucuronico, glutatione, solfato, amminoacidi e acido acetico. I metaboliti delle reazioni di fase II sono generalmente privi di attività biologica e caratterizzati da considerevole polarità; quest'ultima caratteristica ne permette una facile escrezione, per lo più per via renale e/o biliare. Sostanze che contengono già opportuni gruppi funzionali possono andare incontro direttamente a reazioni di fase II [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

In funzione degli studi *in vitro* riportati nel presente elaborato di tesi, relativi al metabolismo dei due composti NBDHEX e MC3181 (vedi “Risultati e discussione”), saranno di seguito trattate alcune fra le reazioni di biotrasformazione sopra elencate. In particolare, tra quelle discusse, le reazioni di ossidazione microsomiali mediate da enzimi appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 e le reazioni di coniugazione con acido glucuronico risultano anche le reazioni di biotrasformazione, rispettivamente di fase I e di fase II, più frequentemente osservate nella maggior parte dei mammiferi [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

#### *1.5.4.1. Reazioni di ossidazione microsomiali*

La maggioranza delle reazioni di biotrasformazione di fase I di xenobiotici sono reazioni di ossidazione catalizzate da enzimi microsomiali appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 (*cytochrome P450*; CYP). I membri della superfamiglia CYP sono accomunati dalla proprietà di formare, in funzione della presenza del gruppo prostetico eme (Fe-protoporfirina IX), un complesso con il monossido di carbonio, il cui spettro di assorbimento presenta un massimo alla lunghezza d'onda di 450 nm; da qui la denominazione “citocromo P450” [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].

I CYP responsabili del metabolismo degli xenobiotici sono localizzati nelle membrane del reticolo endoplasmatico liscio (enzimi microsomiali) e sono espressi principalmente, ma non solo, nel fegato. Tali enzimi sono espressi costitutivamente e possono essere soggetti a induzione enzimatica. Alcune forme di CYP microsomiali e mitocondriali rivestono anche un ruolo importante nella biosintesi e nel catabolismo di sostanze endogene [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].

I CYP catalizzano principalmente reazioni di tipo ossidativo, le quali richiedono la presenza di ossigeno molecolare e nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH), e portano all'incorporazione di uno dei due atomi dell'ossigeno molecolare nella molecola del substrato (reazione di mono-ossigenazione), mentre il secondo atomo viene ridotto ad acqua. L'attività degli enzimi CYP dipende strettamente dalla presenza nella membrana del reticolo endoplasmatico della flavoproteina NADPH-citocromo P450 reduttasi, contenente flavin mononucleotide (FMN) e flavin adenin dinucleotide (FAD). Questa proteina è infatti responsabile del trasferimento di elettroni dal NADPH al gruppo prostetico eme dei CYP. I CYP sono in grado di catalizzare diversi tipi di ossidazioni, tra cui ad esempio ossidrilazioni di carbonio alifatico o aromatico, epossidazioni di doppio legame, dealchilazioni ossidative di eteroatomi, ossidazioni di eteroatomi, e deidrogenazioni [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].

L'attuale sistema di classificazione dei CYP prevede una suddivisione in famiglie e sottofamiglie, in base al grado di identità nella sequenza amminoacidica. Proteine appartenenti alla stessa famiglia presentano almeno il 40% di identità, mentre proteine appartenenti alla stessa sottofamiglia almeno il 55% di identità.

Il sistema di nomenclatura delle proteine CYP e dei relativi geni contempla l'utilizzo in sequenza di:

- l'acronimo CYP (in minuscolo per *Drosophila* e topo);
- un numero arabo indicante la famiglia di appartenenza;
- una lettera maiuscola indicante la sottofamiglia (in minuscolo per *Drosophila* e topo);
- un numero arabo indicante il singolo prodotto genico.

Ad esempio, "CYP3A4" indica il "citocromo P450, famiglia 3, sottofamiglia A, polipeptide 4" E' previsto l'uso del corsivo per la denominazione del gene (es. *CYP3A4*) [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010; Nelson *et al.*, 1996].

Il genoma umano codifica 57 proteine CYP, ripartite in 18 famiglie e 42 sottofamiglie; i CYP responsabili del metabolismo degli xenobiotici nell'uomo (così come, in generale, nei mammiferi) appartengono alle famiglie 1, 2 e 3. Le forme enzimatiche maggiormente implicate nella biotrasformazione dei farmaci nell'uomo risultano essere alcuni membri della sottofamiglia CYP2C (quali CYP2C9 e CYP2C19), il CYP2D6 e il CYP3A4. Quest'ultimo enzima riveste particolare importanza, in quanto si rivela il CYP più abbondante nel fegato e

nell'intestino tenue, e poiché coinvolto nel metabolismo di quasi il 50% dei farmaci di uso corrente in terapia umana [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010].

Alle reazioni di ossidazione microsomiali partecipano anche gli enzimi denominati monoossigenasi flaviniche (FMO). Essi contengono FAD come gruppo prostetico e catalizzano l'ossidazione di substrati che presentano eteroatomi nucleofili quali azoto, zolfo e fosforo. Come i CYP, le FMO richiedono la presenza di ossigeno molecolare e di NADPH, e portano all'incorporazione di un singolo atomo di ossigeno nel substrato (reazione di mono-ossigenazione). Diverse reazioni catalizzate da FMO possono essere mediate anche da CYP. La famiglia delle FMO nei mammiferi include 5 membri (FMO1-FMO5), espressi in particolare in fegato, polmone e rene. L'espressione di tali proteine si è dimostrata specie- e tessuto-specifica. Per quanto riguarda le FMO umane, le FMO3 e FMO5 sono le forme predominante nel fegato dell'uomo adulto; la FMO5 è attiva solo su pochi xenobiotici [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].

#### *1.5.4.2. Reazioni di ossidazione mediate da alcol deidrogenasi e aldeide deidrogenasi*

Enzimi responsabili di reazioni di ossidazione sono presenti non solo nel reticolo endoplasmatico (microsomi), ma anche nel citosol e nei mitocondri di vari tessuti. Alla luce degli studi di biotrasformazione descritti nel presente elaborato di tesi (vedi "Risultati e discussione"), verranno di seguito analizzate nello specifico le reazioni di ossidazione non microsomiali catalizzate dagli enzimi alcol deidrogenasi (ADH) e aldeide deidrogenasi (ALDH). Tali proteine rivestono particolare importanza nell'ossidazione di alcoli alifatici a corta catena nei corrispondenti acidi carbossilici; ne costituisce un tipico esempio l'etanolo, convertito da ADH e ALDH dapprima in acetaldeide e successivamente in acido acetico [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].

Le ADH sono enzimi contenenti zinco presenti nel citosol di diversi tessuti, principalmente il fegato, ma anche il rene, il polmone e la mucosa gastrica. Le ADH catalizzano reazioni di ossidazione di alcoli alifatici e aromatici nelle rispettive aldeidi (o chetoni), e richiedono la presenza di nicotinammide adenina dinucleotide ossidato ( $\text{NAD}^+$ ) quale cofattore. Nell'uomo sono state identificate 7 ADH, appartenenti a 5 classi (I-V); gli enzimi ADH di classe I (presenti in quantità elevate nel fegato e nelle ghiandole surrenali) intervengono

nell'ossidazione dell'etanolo e di altri alcoli alifatici a basso peso molecolare. Tali enzimi sono inibiti dal pirazolo e dai suoi 4-alchil derivati (ad es il 4-metilpirazolo) [Parkinson e Ogilvie, 2010]. Va sottolineato che alcuni enzimi ADH di classe I e II umani si sono dimostrati capaci di catalizzare non solo l'ossidazione di alcoli nelle corrispondenti aldeidi, ma anche la successiva ossidazione di queste ultime nei rispettivi acidi carbossilici [Svensson *et al.*, 1999, e referenze ivi contenute].

Le ALDH sono enzimi citosolici e mitocondriali capaci di catalizzare l'ossidazione di aldeidi ad acidi carbossilici, mediante l'utilizzo di  $\text{NAD}^+$  quale cofattore. Nell'uomo sono stati individuati almeno 19 diversi geni codificanti ALDH; le ALDH umane differiscono nella sequenza amminoacidica e presentano diversa distribuzione tissutale e localizzazione subcellulare. Di particolare importanza risulta l'aldeide deidrogenasi 2 (ALDH2), enzima presente nei mitocondri epatici e di svariati tessuti, in grado di catalizzare efficientemente l'ossidazione di varie aldeidi a basso peso molecolare, tra cui l'acetaldeide derivante dall'ossidazione dell'etanolo [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].

#### *1.5.4.3. Reazioni di glucuronidazione*

Come detto in precedenza, le reazioni di coniugazione con acido glucuronico, dette anche glucuronoconiugazioni o glucuronidazioni, sono le reazioni di biotrasformazione di fase II più frequentemente osservate nella maggior parte dei mammiferi, incluso l'uomo. Esse sono catalizzate dagli enzimi UDP-glucuronosiltrasferasi (UGT) e consistono nel trasferimento di una molecola di acido glucuronico dal cofattore UDP-glucuronato (UDPGA, forma attivata dell'acido glucuronico) a gruppi funzionali contenenti eteroatomi nucleofili ricchi di densità elettronica, quali ossigeno, azoto e zolfo. Tra i substrati delle UGT si trovano dunque alcoli, fenoli, acidi carbossilici alifatici e aromatici, ammine aromatiche e alifatiche, e composti contenenti gruppi sulfidrilici. Oltre a xenobiotici, risultano substrati di UGT anche alcuni composti endogeni. I coniugati con acido glucuronico sono generalmente polari, idrosolubili e facilmente eliminabili con le urine o la bile. Solitamente la glucuronidazione dà origine a prodotti inattivi, ma vi sono anche casi di prodotti di glucuronidazione caratterizzati da significativa attività biologica o tossicità [Parkinson e Ogilvie, 2010; Quintieri, 2006].



Le UGT sono espresse in numerosi distretti, tra i quali fegato, rene, tratto gastrointestinale e polmone. Analogamente ai CYP, le UGT sono proteine integrali del reticolo endoplasmatico. Esse presentano il sito catalitico rivolto verso il lume di questo compartimento subcellulare; dal momento che l'UDPGA è un cofattore idrosolubile e la cui biosintesi si realizza nel citosol, si pensa che a permetterne il passaggio dal citoplasma al lume del reticolo endoplasmatico intervengano trasportatori di membrana [Parkinson e Ogilvie, 2010; Wu *et al.*, 2011].

In base al grado di identità nella sequenza aminoacidica, le UGT sono state suddivise in famiglie e sottofamiglie. Nell'uomo sono state al momento identificate 22 UGT, appartenenti alle famiglie UGT1, UGT2, UGT3 e UGT8. Le sottofamiglie UGT1A e UGT2B comprendono la maggior parte delle forme enzimatiche coinvolte nella glucuronidazione degli xenobiotici nell'uomo [Quintieri, 2006; Parkinson e Ogilvie, 2010; Wu *et al.*, 2011].



## 2. CONTESTO E SCOPO DEL LAVORO

L'attività svolta nell'ambito del Dottorato di Ricerca ha riguardato alcuni aspetti della caratterizzazione preclinica *in vitro* di nuovi inibitori non peptidomimetici della glutatione trasferasi (glutatione *S*-trasferasi, GST) P1-1. Tale proteina è coinvolta non solo nella detossificazione di numerose sostanze esogene ed endogene, ma anche nella fine regolazione di processi cellulari quali la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi. La GSTP1-1 è inoltre notoriamente sovraespressa in numerosi tumori umani, nei quali concorre a conferire un fenotipo di poliresistenza ad agenti antineoplastici. L'inibizione dell'attività GSTP1-1 rappresenta quindi un possibile approccio al trattamento delle neoplasie (vedi "Introduzione").

In particolare, l'attività di ricerca condotta si proponeva di:

1) ottenere informazioni circa la stabilità metabolica del 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e del suo analogo strutturale denominato "MC3181", con particolare riferimento alla loro possibile biotrasformazione epatica. NBDHEX e MC3181 sono candidati farmaci ad attività antitumorale progettati e sintetizzati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa A. M. Caccuri (Università di Roma "Tor Vergata") e la cui attività terapeutica è correlata ad inibizione dell'attività GSTP1-1 (vedi "Introduzione");

2) valutare il potenziale effetto inibitorio sull'attività GST di nuovi analoghi strutturali del farmaco sulfasalazina (salicilazosulfapiridina, SASP). La SASP, profarmaco dell'acido 5-aminosalicilico e della sulfapiridina attualmente in uso per il trattamento di malattie infiammatorie intestinali croniche e dell'artrite reumatoide, è un inibitore di alcune GST umane, tra cui la GSTP1-1. Essa non si presta tuttavia all'uso *in vivo* quale inibitore di GST, a causa della scarsa biodisponibilità orale e della marcata instabilità metabolica, riconducibile per lo più alla presenza di un gruppo azoico. Da qui l'idea di sintetizzare nuovi analoghi strutturali della SASP caratterizzati da una maggior stabilità metabolica e selettività d'azione nei confronti della GSTP1-1. Lo studio è stato reso possibile grazie alla stretta collaborazione del gruppo di ricerca della Prof.ssa S. Castellano (Università degli Studi di Salerno) che ha provveduto alla sintesi di 30 analoghi strutturali della SASP a nucleo benzimidazolico.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1. Reagenti

L'acqua ultrapura con cui sono stati preparati tutti i tamponi e le soluzioni acquose è stata ottenuta tramite un apparecchio *PureLab Option-Q* (Elga LabWater, High Wycombe, UK).

I composti 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e MC3181 sono stati forniti dalla Prof.ssa Anna Maria Caccuri (Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università di Roma "Tor Vergata").

I derivati benzimidazolici e l'estere metilico della sulfasalazina (SASP) sono stati forniti dalla Prof.ssa Sabrina Castellano (Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Salerno).

L'S-glutationil-2,4-dinitrobenzene (GS-DNB) è stato preparato precedentemente nel nostro laboratorio per reazione del glutatione ridotto (GSH) con l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, secondo il protocollo descritto da Hinchman *et al.* (1991).

Il nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH) e il peptide alameticina sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (USA). Soluzioni *stock* di alameticina alla concentrazione finale di 5 mg/mL sono state preparate in dimetilsolfossido (DMSO), aliquotate e conservate a -20°C.

L'etanolo, l'acido cloridrico, l'acido acetico e l'acido formico (HCOOH) sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti S.p.A. (Milano).

L'enzima glutatione trasferasi (GST) isolata da placenta umana è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano) sotto forma di prodotto liofilizzato, contenente 0,47 mg di proteina. Il preparato è stato successivamente solubilizzato in 2,6 mL di una soluzione tampone a pH 6,5 contenente 0,1 M potassio fosfato monobasico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 mM acido etilendiamminotetracetico (EDTA) e 1 mM GSH; è stata ottenuta quindi una soluzione finale contenente 0,18 mg di proteina/mL, che è stata aliquotata in microprovette di polipropilene contenenti 100 µL, mantenute a -20°C.

Le GST ricombinanti umane sono state acquistate dalla Oxford Biomedical Research (Rochester Hills, Michigan, USA) in forma di soluzione contenente 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM cloruro di sodio (NaCl), 1 mM ditiotreitolo

(DTT), 1 o 5 mM EDTA, e 50% (v/v) glicerolo, e diluite in una soluzione analoga (contenente 1 mM EDTA) così da ottenere soluzioni finali contenenti 40 µg di proteina/mL. Queste ultime sono state aliquotate in microprovette di polipropilene conservate a -20°C.

I microsomi epatici umani (un *pool* di microsomi isolati dal fegato di 50 donatori di entrambi i sessi), di ratto Sprague-Dawley (*pool* da individui di solo sesso maschile o femminile), e di topo CD-1 (*pool* di individui di solo sesso maschile o femminile), così come il citosol di fegato umano (*pool* da 50 donatori di entrambi i sessi), di ratto Sprague-Dawley (*pool* da individui di solo sesso maschile o femminile) e di topo CD-1 (*pool* da individui di solo sesso maschile o femminile), sono stati ottenuti dalla Xenotech LLC (Lenexa, Kansas, USA).

Tutti gli altri reagenti utilizzati nel presente lavoro di tesi, tra cui la SASP, il GSH, l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), l'acido UDP-glucuronico (UDPGA), il nicotinammide adenina dinucleotide ossidato (NAD<sup>+</sup>), il 4-metilpirazolo (4-MP) e l'acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich S.r.l.

### **3.2. Valutazione della stabilità di NBDHEX e di MC3181 al metabolismo epatico microsomiale e citosolico**

#### *3.2.1. Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con microsomi epatici umani, di ratto e di topo, in presenza di UDPGA*

Al fine di valutare la possibile glucuronidazione di NBDHEX e di MC3181, microsomi epatici umani, di ratto o di topo, sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti in provette di polipropilene contenenti tampone Tris (pH 7,5), cloruro di magnesio (MgCl<sub>2</sub>), NBDHEX o MC3181, e il peptide alameticina. Dopo trasferimento delle suddette miscele per 3 minuti in bagno termostato a 37°C (equilibratura termica), si è proceduto ad avviare le reazioni mediante l'aggiunta del cofattore UDPGA. La composizione finale delle miscele di reazione così ottenute (volume finale: 0,2 mL) era la seguente: 0,1 M Tris (pH 7,5), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM NBDHEX o MC3181, 0,5 mg/mL di proteine microsomiali, 25 µg/mL di alameticina, 2 mM UDPGA, ≤ 2% (v/v) di DMSO (solvente utilizzato per la solubilizzazione dell'NBDHEX, dell'MC3181 e dell'alameticina). Tutte le reazioni sono state condotte a 37°C e arrestate, dopo opportuni intervalli di tempo (15-120 min.), mediante l'aggiunta a ciascun campione di 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN mantenuto in ghiaccio, agitazione al vortex e trasferimento in ghiaccio. Campioni

“tempo 0” sono stati allestiti aggiungendo tutti i componenti tipici della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN. Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, in assenza del cofattore UDPGA. I campioni sono stati quindi centrifugati a 20000g per 10 minuti a 4°C, al fine di allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile a 433 nm (vedi “3.2.5. *Analisi HPLC*”), o, grazie alla stretta collaborazione del Dott. Daniele Dalzoppo (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova) mediante cromatografia liquida (*Liquid Chromatography*, LC) accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi (*Diode Array Detector*, DAD) e spettrometria di massa tandem (*Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS; vedi “3.2.6. *Analisi LC-DAD-MS/MS*”).

### *3.2.2. Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con microsomi epatici umani, di ratto e di topo, in presenza di NADPH*

Nell'intento di valutarne la possibile ossidazione da parte di enzimi microsomiali epatici dipendenti da NADPH, l'NBDHEX e l'MC3181 (concentrazione finale: 10 µM o 50 µM) sono stati incubati in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4), 0,5 mM NADPH, e 0,5 mg/mL di microsomi epatici umani, di ratto o di topo. La concentrazione di CH<sub>3</sub>CN (solvente utilizzato per la solubilizzazione iniziale dell'NBDHEX e dell'MC3181) inevitabilmente presente nelle miscele di reazione, era pari allo 0,5% o all'1% (v/v). Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei microsomi epatici agli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente preincubati per 3 minuti in bagno termostato a 37°C), condotte a 37°C, e infine arrestate dopo intervalli di tempo prestabiliti (2-30 min.) mediante l'aggiunta di 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN mantenuto in ghiaccio. Campioni “tempo 0” sono stati preparati aggiungendo tutti i componenti tipici della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio e contenenti 0,1 mL di CH<sub>3</sub>CN. Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, in assenza del cofattore NADPH. I campioni così ottenuti sono stati agitati tramite vortex, posti in ghiaccio e centrifugati a 20000g, per 10 minuti a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti sono state quindi trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi “3.2.5. *Analisi HPLC*”).

In seguito, nell'intento di valutare il metabolismo microsomiale NADPH-dipendente di NBDHEX e di MC3181 mediante analisi LC-DAD-MS/MS, ciascun farmaco (concentrazione finale: 50  $\mu$ M) è stato incubato in un mezzo di reazione (volume finale: 0,4 mL) contenente 0,05 M  $\text{HK}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 0,5 mM NADPH e 0,5 mg/mL di microsomi epatici umani; la concentrazione di  $\text{CH}_3\text{CN}$  presente nelle miscele di reazione era pari all'1% (v/v). La reazione è stata avviata con l'aggiunta dei microsomi agli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente preincubati a 37°C per 3 minuti), condotta a 37°C per 60 minuti, e infine arrestata mediante l'aggiunta di 0,2 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Il campione così ottenuto è stato agitato al vortex, posto in ghiaccio, e centrifugato a 20000g per 10 minuti a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Un'aliquota del surnatante è stata quindi trasferita in fialetta da autocampionatore e successivamente analizzata mediante LC-DAD-MS/MS (vedi "3.2.6. *Analisi LC-DAD-MS/MS*").

### *3.2.3. Incubazione di NBDHEX e di MC3181 con citosol di fegato umano, di ratto e di topo, in presenza di $\text{NAD}^+$*

Al fine di valutarne la possibile ossidazione da parte di enzimi citosolici epatici dipendenti da  $\text{NAD}^+$  (alcol deidrogenasi, ADH, e aldeide deidrogenasi, ALDH), l'NBDHEX e l'MC3181 (concentrazione finale: 10  $\mu$ M) sono stati incubati in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,05 o 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 0,5 mg/mL di citosol di fegato umano, di ratto o di topo, e 1 mM  $\text{NAD}^+$ ; la concentrazione di DMSO (solvente utilizzato per la solubilizzazione iniziale dell'NBDHEX e dell'MC3181) inevitabilmente presente nelle miscele di reazione, era  $\leq$  allo 0,5% (v/v). Dopo trasferimento delle suddette miscele per 3 minuti in bagno termostato a 37°C (equilibratura termica), le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del substrato (NBDHEX o MC3181), condotte a 37°C, e infine arrestate dopo intervalli di tempo prestabiliti (5-30 min.) aggiungendo 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. Campioni "tempo 0" sono stati allestiti aggiungendo tutti i componenti tipici della miscela di reazione (volume finale: 0,2 mL) a provette mantenute in ghiaccio, contenenti 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Reazioni di controllo sono state condotte, inoltre, in assenza del cofattore  $\text{NAD}^+$ . I campioni sono stati quindi centrifugati a 20000g per 10 minuti a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fialette da autocampionatore e analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi "3.2.5. *Analisi HPLC*").



Successivamente, nell'intento di valutare il metabolismo ossidativo citosolico  $\text{NAD}^+$ -dipendente dell'*NBDHEX* mediante analisi LC-DAD-MS/MS, il composto è stato incubato alla concentrazione finale 50  $\mu\text{M}$  in un mezzo di reazione (volume finale: 0,4 mL) contenente 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 0,5 mg/mL di citosol di fegato umano e 1 mM  $\text{NAD}^+$ ; la concentrazione di DMSO presente nelle miscele di reazione era pari allo 0,5% (v/v). La reazione è stata avviata con l'aggiunta dell'*NBDHEX* agli altri componenti del mezzo di reazione (precedentemente preincubati a 37°C per 3 minuti), condotta a 37°C per 120 minuti, e infine arrestata mediante l'aggiunta di 0,2 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Il campione è stato quindi agitato al vortex, posto in ghiaccio e centrifugato a 20000g per 10 minuti a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Un'aliquota del surnatante così ottenuto è stata trasferita in fialetta da autocampionatore e successivamente analizzata mediante LC-DAD-MS/MS (vedi "3.2.6. Analisi LC-DAD-MS/MS").

#### *3.2.4. Incubazione di NBDHEX con citosol di fegato umano, di ratto maschio e di topo maschio, in presenza di $\text{NAD}^+$ e di 4-MP*

Allo scopo di valutare il potenziale coinvolgimento di ADH nella biotrasformazione citosolica epatica di *NBDHEX* osservata negli esperimenti precedenti, il farmaco (concentrazione finale: 10  $\mu\text{M}$ ) è stato incubato in un mezzo di reazione (volume finale: 0,2 mL) contenente 0,05 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4), 0,5 mg/mL di citosol di fegato umano (*pool* da individui di entrambi i sessi), di ratto maschio o di topo maschio, 1 mM  $\text{NAD}^+$ , e in assenza (controllo) o in presenza di concentrazioni crescenti di 4-MP (5, 50, 250 e 1000  $\mu\text{M}$ ). La concentrazione di DMSO presente nelle miscele di reazione era pari allo 0,5% (v/v). Dopo trasferimento delle suddette miscele per 15 minuti in bagno termostato a 37°C (equilibratura termica), le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta del substrato (*NBDHEX*), condotte a 37°C per 30 minuti, e infine arrestate aggiungendo 0,1 mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$  mantenuto in ghiaccio. I campioni sono stati quindi centrifugati a 20000g per 10 minuti a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote dei surnatanti così ottenuti sono state trasferite in fialette da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC con rivelazione UV-visibile (vedi "3.2.5. Analisi HPLC").

#### *3.2.5. Analisi HPLC*

L'analisi dei surnatanti di reazione mediante HPLC con rivelazione UV-visibile è stata condotta utilizzando un cromatografo Hewlett-Packard/Agilent

serie 1100 (Agilent Technologies GMBH, Germany) costituito da una pompa quaternaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore termostato, un comparto colonna termostato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile, e un rivelatore DAD. L'apparecchiatura era controllata da un Personal Computer, dotato di uno specifico software (ChemStation for LC, Hewlett-Packard, USA) che ha reso possibile l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (3 x 150 mm, 5  $\mu$ m), termostata a 28°C.

Il volume del campione iniettato era di 30  $\mu$ L.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- un "solvente A" costituito da 10 mM bicarbonato di ammonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) (portato a pH 6,8 con acido acetico)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10, v/v);
- un "solvente B" costituito da  $\text{CH}_3\text{CN}$  100%.

Il programma di eluizione prevedeva un'eluizione isocratica con 100% di solvente A per i primi 2 minuti, seguita da un'eluizione a gradiente da 0 a 70% di solvente B nei successivi 8 minuti, e da un'ultima eluizione isocratica con 70% di solvente B fino al termine della corsa cromatografica (15 minuti). Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,4 mL/min.

Nelle suddette condizioni cromatografiche, i  $t_R$  dell'NBDHEX e dell'MC3181 erano, rispettivamente, di 13,2 e di 11,4 minuti.

### 3.2.6. Analisi LC-DAD-MS/MS

L'analisi dei surnatanti di reazione mediante LC-DAD-MS/MS è stata condotta utilizzando un sistema cromatografico Agilent 1290 Infinity (comprendente una pompa binaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore, un comparto colonna termostato e un rivelatore DAD) accoppiato ad uno spettrometro di massa XEVO G2S (Waters) a ionizzazione elettrospray (ESI)/quadrupolo(Q)/tempo di volo (TOF).

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 HD (2,1 x 50 mm, 1,8  $\mu$ m), termostata a 28°C.

Il volume del campione iniettato era di 1-5  $\mu$ L.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- un "solvente A" costituito da 5 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (portato a pH 6,8 con acido acetico)/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10, v/v);
- un "solvente B" costituito da  $\text{CH}_3\text{CN}$  100%.

Per quanto riguarda le analisi di glucuronidazione, il programma di eluizione prevedeva un'eluizione a gradiente da 0 al 100% di solvente B nei primi 1,5 minuti, seguita da un'eluizione isocratica con 100% di solvente B per 1 minuto, da un'ulteriore eluizione a gradiente da 100 a 0% di solvente B nei successivi 30 secondi, e infine da un'eluizione isocratica con 100% di solvente A fino al termine della corsa cromatografica (4 minuti).

Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,2 mL/min. Il rivelatore DAD era impostato alle lunghezze d'onda di 254 e 433 nm.

Nelle suddette condizioni cromatografiche, i  $t_R$  dell'NBDHEX e dell'MC3181 erano, rispettivamente, di 2,3 e di 1,9 minuti.

Per quanto riguarda le analisi di metabolismo ossidativo microsomiale e citosolico, il programma di eluizione prevedeva un'eluizione isocratica con 100% di solvente A per i primi 4 minuti, seguita da un'eluizione a gradiente da 0 a 70% di solvente B nei successivi 10 minuti, quindi da un'eluizione isocratica con 70% di solvente B per 4 minuti, da un'ulteriore eluizione a gradiente da 70 a 0% di solvente B nei 2 minuti seguenti, e infine da un'eluizione isocratica con 100% di solvente A fino al termine della corsa cromatografica (26 minuti). Il flusso della fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 0,05 mL/min. Il rivelatore DAD era impostato alle lunghezze d'onda di 254 e 433 nm. Nelle suddette condizioni cromatografiche, i  $t_R$  dell'NBDHEX e dell'MC3181 erano, rispettivamente, di 16,2 e di 14,1 minuti.

Lo spettrometro di massa XEVO G2S operava nelle seguenti condizioni: ionizzazione elettrospray negativa (ES-); voltaggio del capillare, 2,5 kV; voltaggio del cono, 15 V; temperatura della sorgente, 100°C; temperatura del gas di desolvatazione, 350°C; energia di collisione, 6 V (analisi MS) o 15 V (analisi MS/MS). I dati spettrometrici sono stati acquisiti in modalità *full scan* in un intervallo di  $m/z$  (rapporto massa atomica su carica dello ione) compreso tra 50 e 1200 e con tempo di campionamento di 1 secondo. L'analisi degli spettri in modalità MS e in modalità MS/MS è stata effettuata con il *software* MassLynx v.4.1 (Waters).

### **3.3. Biosintesi, isolamento ed analisi di risonanza magnetica nucleare (NMR) del prodotto di coniugazione dell’NBDHEX con acido glucuronico (NBDHEX-glucuronide)**

#### *3.3.1. Biosintesi dell’NBDHEX-glucuronide e sua purificazione mediante HPLC semipreparativa*

Al fine di una caratterizzazione strutturale del prodotto di reazione dell’NBDHEX con UDPGA (NBDHEX-glucuronide) mediante NMR si è resa necessaria la sintesi e la purificazione di una quantità di tale prodotto dell’ordine del mg. A tale scopo, l’NBDHEX è stato incubato in una miscela di reazione del volume finale di 100 mL contenente 0,1 M Tris (pH 7,5), 5 mM  $MgCl_2$ , 0,6 mg/mL di microsomi epatici di ratto maschio e 2 mM UDPGA. La concentrazione finale di NBDHEX era pari a 100  $\mu$ M. La reazione è stata condotta a 37°C per 6 ore ed arrestata mediante l’aggiunta di 50 mL di  $CH_3CN$  mantenuto in ghiaccio. Il campione così ottenuto è stato in seguito agitato tramite vortex, posto in ghiaccio e centrifugato a 20000g per 10 minuti a 4°C, per allontanare le proteine denaturate. Aliquote del surnatante così ottenuto sono state quindi sottoposte a HPLC semipreparativa al fine di isolare la frazione della miscela corrispondente al prodotto di glucuronidazione. La separazione è stata condotta grazie alla collaborazione del Dott. Alessandro Orsetti (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova) utilizzando un cromatografo Jasco (Jasco Analytical Instruments, Giappone) dotato di una doppia pompa (PU-1580) ed un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile (UV-1575) settato alla lunghezza d’onda di 433 nm, abbinato ad una colonna semipreparativa Agilent Zorbax RX C-18 (9,4 x 250 mm, 5  $\mu$ m).

Il volume del campione iniettato era di 0,2 mL.

La fase mobile utilizzata era composta da:

- un “solvente A” costituito da  $H_2O$ ;
- un “solvente B” costituito da  $CH_3CN/H_2O$  (95:5, v/v).

Il programma di eluizione prevedeva un’eluizione isocratica con 70% di solvente A per i primi 2 minuti, seguita da un’eluizione a gradiente da 30 a 70% di solvente B nei successivi 8 minuti, da un’ulteriore eluizione isocratica con 70% di solvente B per i seguenti 5 minuti, da un’eluizione a gradiente da 70 a 30% di solvente B per 1 minuto, e infine da un’ultima eluizione isocratica con 70% di solvente A fino al termine della corsa cromatografica (21 minuti). Il flusso della

fase mobile, mantenuto costante per tutta la durata della corsa, era di 4 mL/min. Le eluizioni sono state condotte mantenendo la colonna a temperatura ambiente. Nelle suddette condizioni cromatografiche il  $t_R$  dell'NBDHEX era di 16,2 minuti, mentre il  $t_R$  del picco raccolto per la successiva analisi NMR era di 9,7 minuti.

### 3.3.2. Analisi NMR

Le frazioni corrispondenti al picco con  $t_R$  pari a 9,7 minuti sono state raccolte, riunite e liofilizzate, ottenendo un campione del peso di 3,4 mg. Il liofilizzato è stato quindi portato in soluzione in acqua deuterata ( $D_2O$ ) al fine di ottenere una soluzione 4,7 mg/mL, successivamente consegnata al Dott. Massimo Bellanda (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Padova) per l'analisi. Tutti gli esperimenti sono stati acquisiti a 25°C, utilizzando uno spettrometro NMR Bruker DRX-400 (Newark, Delaware, USA) operante a 400 MHz nella frequenza del protone.

## 3.4. Valutazione dell'effetto inibitorio della SASP e dei suoi analoghi sull'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana

L'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana è stata determinata valutando la formazione di GS-DNB a partire da CDNB e GSH, sia in assenza (controllo) che in presenza di SASP o un suo analogo (EML). Il CDNB, infatti, è in grado di formare un coniugato con il GSH, il GS-DNB (vedi Figura 2 in "Introduzione"), in una reazione catalizzata da varie GST (Habig *et al.*, 1974), tra cui la GSTP1-1.

L'identificazione e la quantificazione del GS-DNB è stata effettuata mediante cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) utilizzando un metodo messo a punto precedentemente nel laboratorio da me frequentato.

### 3.4.1. Condizioni di incubazione

Il CDNB è stato incubato a 37°C in un mezzo (volume finale: 0,4 mL) contenente 0,1 M  $KH_2PO_4$ /1 mM EDTA (pH 6,5) e 0,36 µg di GST, sia in assenza (controllo) che in presenza di concentrazioni crescenti (5, 10, 25, 50, 100 µM) di SASP o un suo analogo. La concentrazione finale di GSH e CDNB nel mezzo di

reazione era pari a 1 mM ed il mezzo di reazione conteneva sempre l'1% di DMSO (solvente utilizzato per la solubilizzazione della SASP e dei suoi analoghi) e l'1% di metanolo (solvente utilizzato per la solubilizzazione del CDNB).

Le reazioni sono state avviate mediante l'aggiunta dei due substrati (CDNB e GSH) agli altri componenti del mezzo di reazione, preincubati per 3 minuti a 37°C, ed arrestate dopo 2 minuti mediante l'aggiunta di 20 µL di acido perclorico al 20% (p/v). I campioni così ottenuti sono stati agitati con un vortex, posti in ghiaccio ed infine centrifugati a 20000g per 10 minuti a 4°C per allontanare le proteine denaturate. Aliquote di ciascun surnatante sono state trasferite in fiale da autocampionatore e successivamente analizzate mediante HPLC.

Reazioni di controllo sono state condotte parallelamente in assenza di proteina al fine di quantificare la frazione di prodotto coniugato che si formava per reazione spontanea del CDNB con il GSH. Tutti i dati riportati in questa tesi sono stati elaborati sottraendo la quota di GS-DNB che si formava spontaneamente al quantitativo totale del coniugato rilevato nelle reazioni condotte in presenza di enzima.

Le reazioni sono state effettuate in condizioni di linearità di formazione del GS-DNB nel tempo.

#### *3.4.2. Determinazione del GS-DNB mediante analisi HPLC*

I campioni sono stati analizzati per la presenza di GS-DNB usando un cromatografo Hewlett-Packard 1050 (Agilent Technologies GMBH, Germany), costituito da una pompa quaternaria, un degasatore per i componenti della fase mobile, un autocampionatore, un comparto colonna termostato e un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile fissato a 333 nm. L'apparecchiatura inoltre era controllata da un Personal Computer, dotato di uno specifico software (ChemStation for LC, Hewlett-Packard USA), che ha consentito l'acquisizione e l'elaborazione dei dati.

La separazione cromatografica è stata condotta usando una colonna a fase inversa ZORBAX R<sub>X</sub>-C18 (4,6 mm x 25 cm, 5 µm; Agilent Technologies), mantenuta a temperatura ambiente.

Il volume del campione iniettato era di 50 µL.

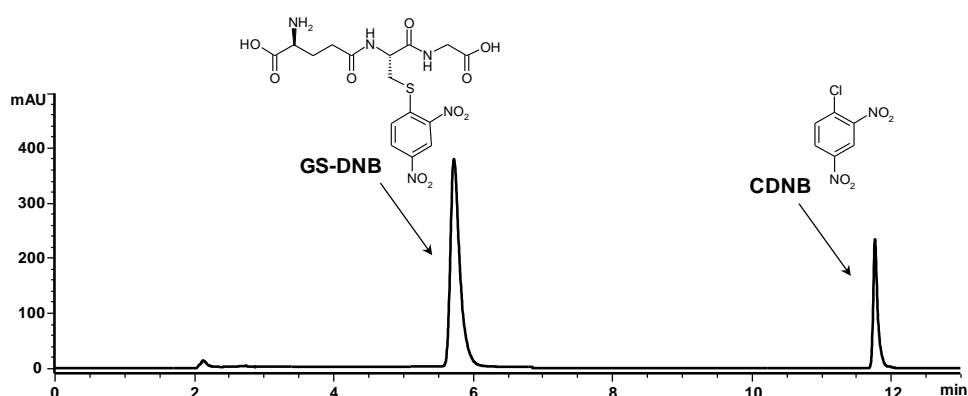
La fase mobile era composta da:

- un "solvente A" costituito da una miscela di 0,1% di HCOOH in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (80:20);
- un "solvente B" costituito da 100% CH<sub>3</sub>CN.

Il programma di eluizione prevedeva un'eluizione isocratica con 100% di solvente A nei primi 2 minuti, seguita da un'eluizione a gradiente da 0 a 60% di solvente B dal 2° al 10° minuto, e da un'ultima eluizione isocratica con 60% di solvente B fino al termine della corsa cromatografica (13 minuti). Per tutta la durata della corsa, il flusso era mantenuto costante ed era pari a 1 mL/min.

In queste condizioni i tempi di ritenzione ( $t_R$ ) del CNDB e del suo prodotto di coniugazione con il GSH, il GS-DNB, erano pari rispettivamente a 11,8 e 5,8 minuti.

In Figura 16 è riportato un esempio di cromatogramma relativo all'analisi di un campione di controllo (reazione di coniugazione condotta in assenza di SASP o un suo analogo).



**Figura 16. Cromatogramma relativo all'analisi HPLC con rivelazione UV ( $\lambda=333$  nm) di una miscela di reazione contenente GSH (1 mM), CDNB (1 mM) e GST isolata da placenta umana (0,36  $\mu$ g) in assenza di SASP o un suo analogo.**

L'effetto inibitorio di ciascuno dei composti analizzati sull'attività coniugativa della GST è stato valutato confrontando l'area del picco del GS-DNB osservato nei cromatogrammi relativi ai campioni sperimentali (presenza di inibitore) con l'area del medesimo picco nei cromatogrammi relativi a reazioni di controllo (assenza di inibitore).

Nelle diagrammi delle Figure 34 e 35 riportati nella sezione “Risultati e discussione”, la formazione del GS-DNB è espressa come percentuale dell'area del relativo picco cromatografico osservato nelle reazioni di controllo (condotte cioè in assenza di SASP o di un suo analogo); nel diagramma della Figura 33 la % di inibizione di formazione del GS-DNB è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ di inibizione} = 100 \times \frac{\text{area del picco cromatografico del GS-DNB in assenza di inibitore} - \text{area del picco cromatografico del GS-DNB in presenza di inibitore}}{\text{area del picco cromatografico del GS-DNB in assenza di inibitore}}$$

### **3.5. Valutazione dell'effetto inibitorio di EML340, EML277, EML259 ed EML337 sull'attività coniugativa di GST A1-1, M1-1 e P1-1 umane ricombinanti**

Tale analisi è stata condotta utilizzando un procedimento sperimentale analogo a quello impiegato nei suddetti saggi di inibizione dell'attività coniugativa di GST isolata da placenta, se non per la variazione della temperatura a cui sono state condotte le reazioni, pari in questo caso a 25°C, e per la concentrazione finale di proteina ricombinante utilizzata, in questo caso pari a 0,2 µg/mL.

### **3.6. Studi di citotossicità *in vitro***

Le linee di melanoma umano A375 e SK-MEL 23 utilizzate nello studio sono state ottenute inizialmente dalla *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA). Le cellule sono state fatte crescere in terreno DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Euroclone) supplementato con il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FBS; Euroclone) inattivato a 56°C per 30 minuti, 2 mM di glutammina (Gln; Euroclone), 100 U/mL di penicillina e 100 µg/mL di streptomycin (Sigma-Aldrich S.r.l.) [terreno completo]. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> di superficie di crescita (Euroclone) mantenute in incubatore termostato a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>.

La citotossicità della SASP e dei suoi analoghi è stata determinata mediante saggio colorimetrico con cristal violetto. Le cellule A375 e SK-MEL 23 sono state seminate in terreno completo rispettivamente alla densità di 1 x 10<sup>5</sup> e 2 x 10<sup>5</sup> cellule/pozzetto in piastre da 6 pozzetti. Il volume finale di sospensione cellulare era pari a 2 mL/pozzetto. Dopo incubazione per 24 ore a 37°C (5% CO<sub>2</sub>), il terreno di coltura è stato rimosso e sostituito con terreno completo contenente diverse concentrazioni dei composti in esame [0 µM (controllo), 50 µM e 100 µM]; le cellule sono coltivate per ulteriori 48 ore (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Le colture contenevano lo 0,1% di DMSO.

Al termine delle 48 ore di trattamento, la crescita cellulare è stata valutata fissando e colorando le cellule con una soluzione di cristal violetto (0,25% p/v di cristal violetto in 90% metanolo-10% formaldeide). Precisamente, dopo aver rimosso il terreno di coltura dai pozzetti, le cellule sono state lavate con tampone



fosfato salino (PBS; 2 mL per pozzetto) e successivamente fissate per 20 minuti in 1 mL di soluzione di cristal violetto. Al termine della fissazione/colorazione l'eccesso di colorante è stato aspirato, le piastre lavate con abbondante acqua corrente e quindi lasciate asciugare all'aria per 24 ore, dopo un ultimo risciacquo in acqua distillata. L'effetto citotossico dei composti è stato valutato sciogliendo il cristal violetto fissato alle cellule in 1,4 mL di etanolo al 70% per 20 minuti in agitazione. Al termine dei 20 minuti di agitazione, l'etanolo è stato trasferito in un microprovetta Eppendorf per limitarne l'eventuale evaporazione. A questo punto, si è potuto procedere alla lettura spettrofotometrica dei campioni (1 mL) ad una lunghezza d'onda di 595 nm (1 mL di etanolo al 70% è stato usato come bianco) utilizzando uno spettrofotometro Uvikon 810 (Kontron Instruments).

### 3.7. Analisi dei dati

I dati riguardanti la valutazione dei livelli relativi di NBDHEX, MC3181,  $M_C$  (metabolita citosolico dell'NBDHEX) e GS-DNB sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard di  $n$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti.

L'emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di NBDHEX e MC3181, nelle diverse condizioni sperimentali, è stata calcolata utilizzando la seguente equazione (cinetica di primo ordine):

$$t_{1/2} = 0,693 / k$$

ove  $k$  rappresenta la pendenza della retta ottenuta mediante regressione lineare dei dati ricavati diagrammando il logaritmo naturale della quantità relativa (%) di substrato rimanente nel mezzo di reazione (valutata in termini di area del rispettivo picco cromatografico), in funzione del tempo di incubazione (minuti).

L'analisi statistica dei dati relativi agli esperimenti di inibizione dell'attività GST (inibizione della produzione di GS-DNB) (Figura 33) è stata condotta mediante ANOVA ad una via seguita dal test di Dunnett. Il confronto statistico tra l'effetto inibitorio sull'attività GST dei composti EML340, EML277, EML259 ed EML337 e l'effetto di una pari concentrazione di SASP (Figura 34), è stato effettuato mediante test  $t$  di Student. Valori di  $P < 0,05$  sono stati considerati significativi.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1. Caratterizzazione *in vitro* della biotrasformazione epatica del 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esanololo (NBDHEX) e del suo analogo strutturale MC3181

Come precedentemente detto (vedi “Contesto e scopo del lavoro”), una prima parte del lavoro descritto nella presente tesi ha avuto quale obiettivo l’ottenimento di informazioni sulla possibile biotrasformazione epatica dei due candidati farmaci ad attività antitumorale 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esanololo (NBDHEX) [Pasello *et al.*, 2011] e MC3181 [De Luca *et al.*, 2014]. Lo studio è stato condotto mediante l’utilizzo di due diverse frazioni subcellulari di fegato, rappresentate da microsomi e citosol, ottenute da fonti commerciali (vedi “Materiali e metodi”). La frazione microsomiale epatica contiene infatti gli enzimi responsabili della catalisi delle reazioni di biotrasformazione degli xenobiotici più frequentemente osservate nella maggior parte dei mammiferi, ovvero i citocromi P450 (*cytochrome P450*, CYP) e le UDP-glucuronosiltransferasi (UGT) (vedi “Introduzione”). I CYP sono in grado, tra l’altro, di catalizzare l’ossidazione sia di sistemi aromatici che di sistemi alifatici, mentre le UGT mediano la glucuronidazione, tra gli altri, di composti contenenti un gruppo ossidrilico (-OH), gruppo funzionale presente nelle molecole in esame (vedi Figura 8 nella sezione “Introduzione”). La frazione citosolica contiene invece, fra gli altri enzimi, le alcol deidrogenasi (ADH) e le aldeide deidrogenasi (ALDH), proteine che rivestono particolare importanza nell’ossidazione di alcoli alifatici e aromatici, nei corrispondenti acidi carbossilici (vedi “Introduzione”). Nello studio sono state utilizzate frazioni subcellulari epatiche umane e derivate dalle due specie più utilizzate nella sperimentazione preclinica dei farmaci, ossia il ratto e il topo; inoltre, per quanto riguarda le sole specie ratto e topo, le analisi sono state condotte con frazioni ottenute sia da individui di solo sesso maschile sia da individui di solo sesso femminile. E’ noto, infatti, che esistono sia differenze tra specie, sia differenze legate al sesso nel metabolismo degli xenobiotici. In particolare, sia nel topo che nel ratto sono state osservate, nel caso di alcuni substrati, differenze marcate tra i due sessi nel metabolismo epatico, sia ossidativo sia di coniugazione con acido glucuronico [Parkinson e Ogilvie, 2010; Mugford e Kedderis, 1998].

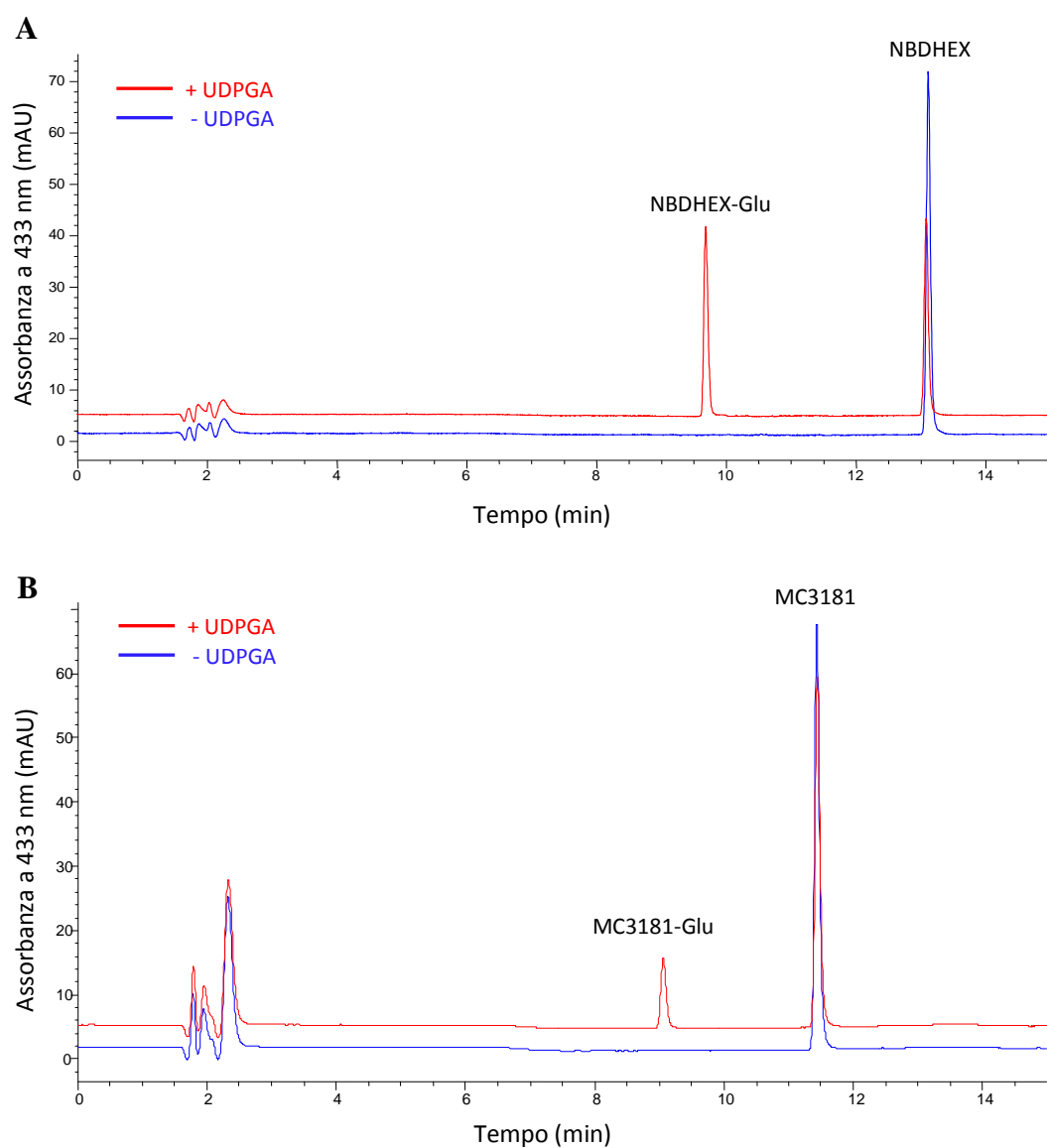
#### 4.1.1. Studi di glucuronidazione

Una prima serie di esperimenti è stata condotta al fine di valutare la possibile glucuronidazione dell’NBDHEX e del suo analogo MC3181. A questo scopo, ciascun composto è stato incubato a 37°C per tempi diversi con microsomi epatici di differente origine in presenza e in assenza (controllo) del cofattore delle reazioni di coniugazione con acido glucuronico, ossia l’acido UDP-glucuronico (UDPGA). Dopo deproteinizzazione, i surnatanti delle miscele di reazione sono stati analizzati mediante cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni (HPLC) con rivelazione visibile ( $\lambda=433$  nm) o mediante cromatografia liquida accoppiata a rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi e spettrometria di massa tandem (LC-DAD-MS/MS), come descritto nella sezione “Materiali e metodi”.

A titolo di esempio, in Figura 17 è riportata una sovrapposizione dei profili cromatografici relativi all’analisi HPLC dei surnatanti ottenuti dopo incubazione di 10  $\mu$ M NBDHEX (Figura 17A) o MC3181 (Figura 17B) per 60 minuti con microsomi epatici di topo maschio, in assenza e in presenza del cofattore UDPGA. Si può osservare come solo i cromatogrammi relativi ai campioni contenenti il cofattore UDPGA siano caratterizzati dalla presenza, oltre che del picco tipico dell’NBDHEX (tempo di ritenzione,  $t_R = 13,2$  min.) o dell’MC3181 ( $t_R = 11,5$  min.), di un secondo picco con  $t_R$  più breve. Tale picco, rappresentante un potenziale prodotto di glucuronidazione e denominato “NBDHEX-Glu” o “MC3181-Glu”, non si osserva nei profili cromatografici relativi al tempo di incubazione pari a 0 minuti. Inoltre, l’area di tale picco aumenta progressivamente in funzione del tempo di incubazione, e la sua comparsa si associa alla progressiva scomparsa del substrato dal mezzo di reazione (risultati non mostrati).

Profili cromatografici analoghi a quelli mostrati in Figura 17 sono stati ottenuti in seguito all’incubazione di NBDHEX e di MC3181 anziché con microsomi epatici di topo maschio, con microsomi epatici di topo femmina, di ratto maschio o femmina, o con un *pool* di microsomi epatici umani di individui di entrambi i sessi.

I risultati sin qui ottenuti indicano dunque che, in tutte le specie considerate, sia l’NBDHEX sia l’MC3181 vanno incontro a metabolismo microsomiale epatico dipendente dalla presenza del cofattore UDPGA (glucuronidazione).

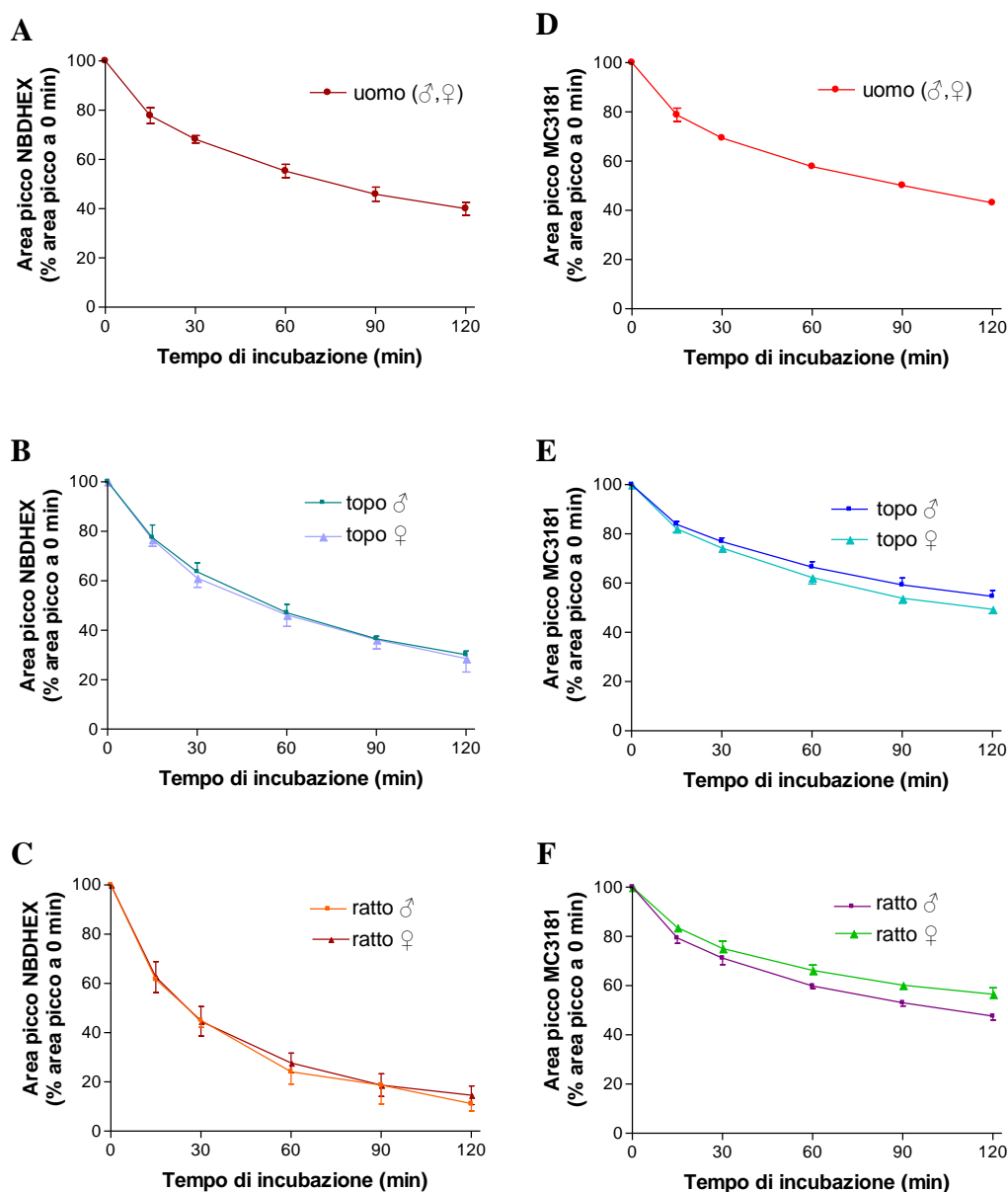


**Figura 17. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC (rivelazione a  $\lambda = 433$  nm) di surnatanti di miscele di incubazione (37°C; 60 min.) di NBDHEX (10  $\mu$ M; riquadro A) e di MC3181 (10  $\mu$ M; riquadro B) con microsomi epatici di topo maschio (0,5 mg proteina/mL), in presenza e in assenza di UDPGA (2 mM). Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione dei campioni e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi" (NBDHEX-Glu: prodotto di coniugazione di NBDHEX con acido glucuronico; MC3181-Glu: prodotto di coniugazione di MC3181 con acido glucuronico).**

Dai diagrammi riportati in Figura 18 è possibile dedurre l'andamento temporale dei livelli di NBDHEX e di MC3181 nelle miscele di incubazione contenenti le varie tipologie di microsomi epatici considerate nello studio, in presenza di UDPGA. Si può notare come la velocità di scomparsa dell'NBDHEX dalle miscele di reazione differisca tra le specie considerate: essa risulta più elevata in presenza di microsomi di topo (emivita di scomparsa,  $t_{1/2}$ , pari a 70,7 e 68,6 min., rispettivamente nel maschio e nella femmina) e soprattutto di ratto ( $t_{1/2}$  pari a 40,1 e 44,4 min, rispettivamente nel maschio e nella femmina) piuttosto che in presenza di microsomi umani ( $t_{1/2}$  pari a 94,9 min.). Non sono state osservate invece differenze sostanziali nella velocità di caduta dei livelli di NBDHEX in funzione del sesso, né nel ratto né nel topo (Figura 18A, 18B e 18C). L'andamento temporale dei livelli di MC3181 nelle miscele di incubazione contenenti microsomi epatici umani si mostra pressoché sovrapponibile a quello dell'NBDHEX nelle miscele contenenti la stessa tipologia di microsomi ( $t_{1/2}$  pari rispettivamente a 107 e 95 min.); l'MC3181 appare invece più stabile, rispetto all'NBDHEX, nelle miscele contenenti microsomi epatici di topo o di ratto (sempre in presenza del cofattore UDPGA) (Figura 18). Infine, si può osservare come i livelli di caduta dell'MC3181 varino in funzione del sesso dell'animale, per quanto riguarda la specie ratto, dove l'emivita di scomparsa dell'MC3181 dal mezzo di reazione è risultata più lunga nella femmina rispetto al maschio ( $t_{1/2}$  pari a 120 e 158 min., rispettivamente nel maschio e nella femmina).

Allo scopo di ottenere maggiori informazioni relative alla natura del metabolita che si forma in seguito ad incubazione di NBDHEX o MC3181 con microsomi epatici e UDPGA, alcuni campioni sono stati analizzati anche, come precedentemente detto, mediante analisi LC-DAD-MS/MS.

In Figura 19 sono riportati, a titolo di esempio, i risultati dell'analisi LC-DAD-MS/MS del surnatante ottenuto da un'incubazione dell'NBDHEX (10  $\mu$ M) con microsomi epatici di ratto maschio (0,5 mg proteina/mL) e UDPGA (2 mM), condotta a 37°C per 60 minuti. Anche in questo caso, così come nel caso delle analisi precedentemente descritte, il tracciato cromatografico a 433 nm (Figura 19, riquadro A) si caratterizza per la presenza, oltre che del picco dell'NBDHEX (identificato sulla base del  $t_R$  grazie alla disponibilità della sostanza pura), per la presenza di un secondo picco con  $t_R$  più breve (denominato "NBDHEX-Glu"). Tale secondo picco era assente quando l'incubazione veniva condotta in assenza di UDPGA (non mostrato).

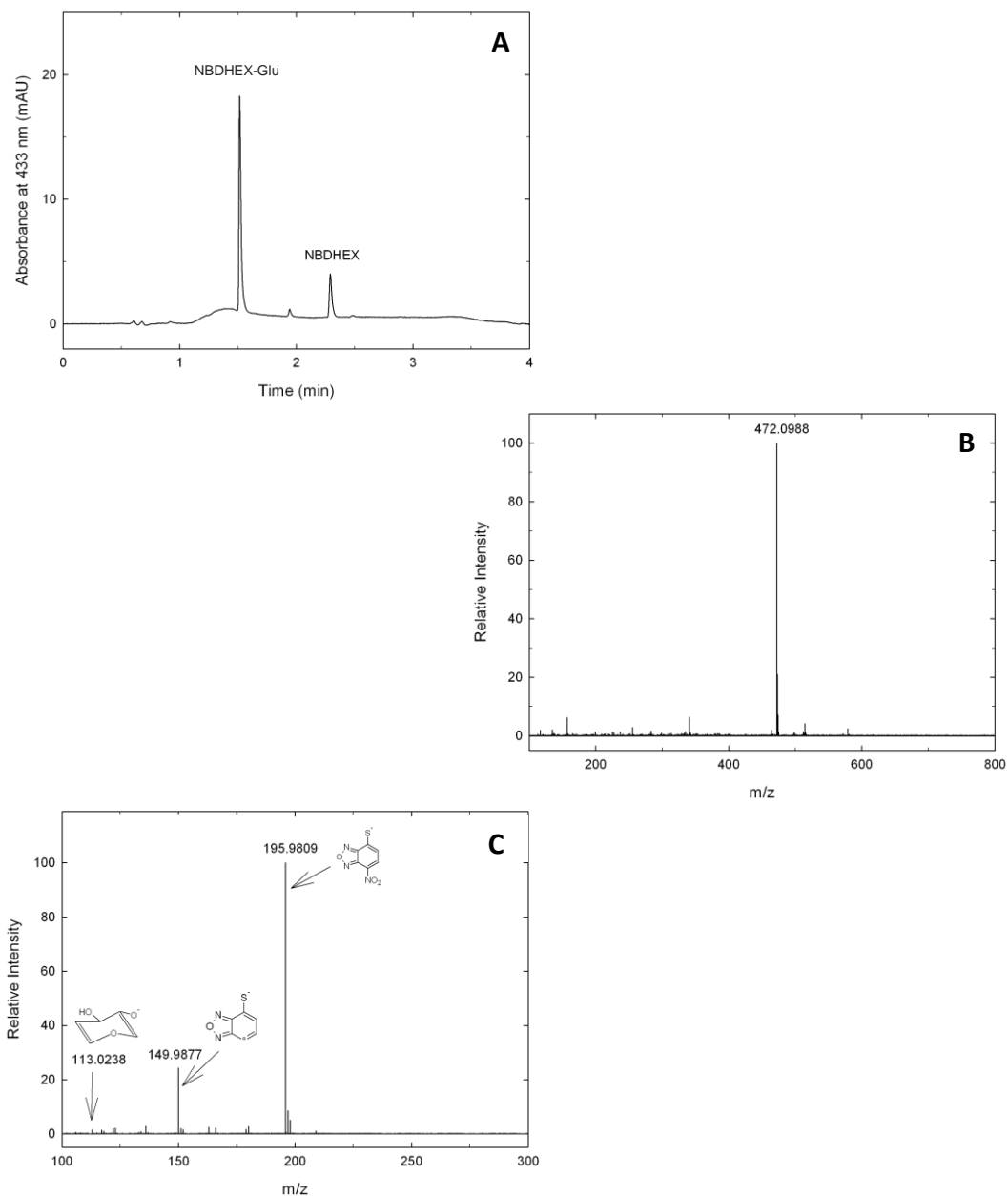


**Figura 18. Stabilità di NBDHEX e MC3181 (10  $\mu$ M) in miscele di incubazione contenenti microsomi epatici (0,5 mg proteina/mL) umani (A e D), murini (B ed E) e di ratto (C e F), e UDPGA (2 mM). Ciascun valore sperimentale è la media  $\pm$  deviazione standard di  $n = 3$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti. In alcuni casi le dimensioni della barra degli errori sono inferiori a quelle del simbolo.**

Emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di NBDHEX: uomo, 94,9 min.; ratto maschio, 40,1 min.; ratto femmina, 44,4 min.; topo maschio, 70,7 min., e topo femmina, 68,6 min.

Emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di MC3181: uomo, 106,6 min.; ratto maschio, 119,5 min.; ratto femmina, 157,5 min.; topo maschio, 144,4 min., e topo femmina, 123,8 min.

Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, processazione dei campioni, analisi cromatografica e calcolo del  $t_{1/2}$  sono riportate nella sezione “Materiali e metodi”.

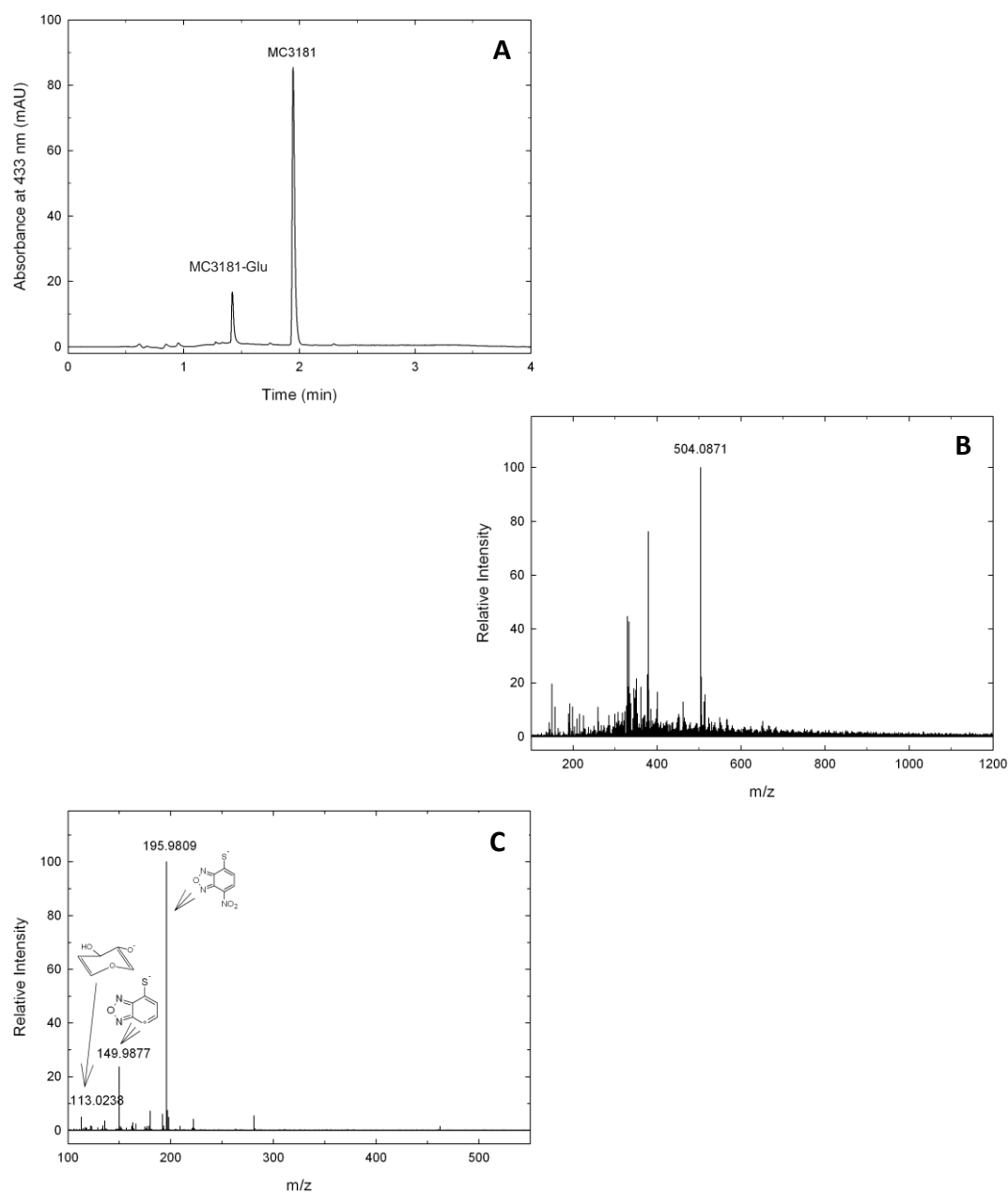


**Figura 19. Analisi LC–DAD–MS/MS del surnatante di una miscela di incubazione (37°C; 60 min.) di NBDHEX (10  $\mu$ M) con microsomi epatici di ratto maschio (0,5 mg proteina/mL), in presenza di UDPGA (2 mM). A) Cromatogramma relativo all’analisi LC–DAD con rivelazione a 433 nm (NBDHEX–Glu: prodotto di coniugazione di NBDHEX con acido glucuronico); B) spettro di massa relativo al picco cromatografico NBDHEX–Glu; C) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico NBDHEX–Glu. Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione del campione e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione “Materiali e metodi”.**



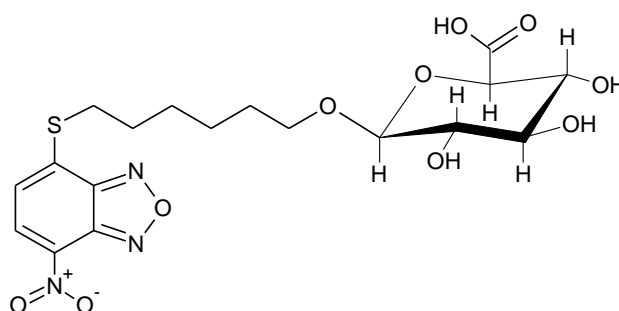
I riquadri B e C in Figura 19 riportano rispettivamente lo spettro di massa del picco cromatografico “NBDHEX-Glu” e lo spettro di frammentazione (MS/MS) dello ione negativo osservato. Come atteso, lo spettro di massa relativo al picco cromatografico denominato “NBDHEX-Glu” (Figura 19, riquadro B), è caratterizzato da un picco con  $m/z$  pari a circa 472, indicativo della presenza di uno ione negativo con una massa molecolare superiore di 176 unità rispetto allo ione negativo derivante dalla ionizzazione dell’NBDHEX ( $m/z = 297$ ; spettro non mostrato). Un incremento della massa molecolare di un composto di 176 Da è tipico delle reazioni di monoglucuronidazione; inoltre, la frammentazione dello ione negativo ( $m/z = 472$ ) porta alla formazione di un frammento ionico ( $m/z = 113$ ) tipico (“*fingerprint ion*”) dei glucuronidi (Figura 19, riquadro C) [Baranczewski *et al.*, 2006].

Risultati simili sono stati ottenuti analizzando mediante LC-DAD-MS/MS un campione preparato incubando l’MC3181 (50  $\mu$ M) a 37°C per 60 minuti con microsomi epatici di ratto maschio (0,5 mg/mL) e UDPGA (2 mM) (Figura 20). Anche in questo caso lo ione negativo del prodotto di reazione ( $t_R = 1,4$  min.) è caratterizzato da una massa ( $m/z = 504$ ) superiore di 176 unità rispetto a quella dello ione negativo dell’MC3181 ( $m/z = 328$ ), e il rispettivo spettro di frammentazione (MS/MS) contiene lo ione *fingerprint* dei glucuronidi con  $m/z$  pari a 113. Anche l’MC3181, così come l’NBDHEX, va incontro dunque a una reazione di glucuronidazione con formazione di un monoglucuronide.



**Figura 20. Analisi LC-DAD-MS/MS del surnatante di una miscela di incubazione (37°C; 60 min.) di MC3181 (10 µM) con microsomi epatici di ratto maschio (0,5 mg proteina/mL), in presenza di UDPGA (2 mM). A) Cromatogramma relativo all'analisi LC-DAD con rivelazione a 433 nm (MC3181-Glu: prodotto di coniugazione di MC3181 con acido glucuronico); B) spettro di massa relativo al picco cromatografico MC3181-Glu; C) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico MC3181-Glu. Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione del campione e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".**

Sulla base dei risultati sin qui ottenuti, ci si è proposti di caratterizzare la struttura del prodotto di glucuronidazione dell'NBDHEX mediante risonanza magnetica nucleare (NMR). Ciò è stato possibile grazie alla stretta collaborazione con il Dott. M. Bellanda del Dipartimento di Scienze Chimiche (Università degli Studi di Padova). Come descritto nella sezione “Materiali e metodi”, al fine di ottenere, per via biosintetica, un quantitativo del prodotto sufficientemente elevato per poter condurre l’analisi NMR, è stata allestita una miscela di reazione di volume relativamente elevato (100 mL) contenente NBDHEX (100  $\mu$ M), microsomi epatici di ratto maschio (0,6 mg proteina/mL) e UDPGA (2 mM), dalla quale, dopo 6 h di incubazione a 37°C, si è proceduto a isolare mediante HPLC semipreparativa il glucuronide formatosi. I dati ottenuti grazie all’analisi NMR al protone e al  $^{13}\text{C}$  eseguita dal Dott. Bellanda, indicano che il composto isolato è un O- $\beta$ -glucuronide avente la struttura riportata in Figura 21.

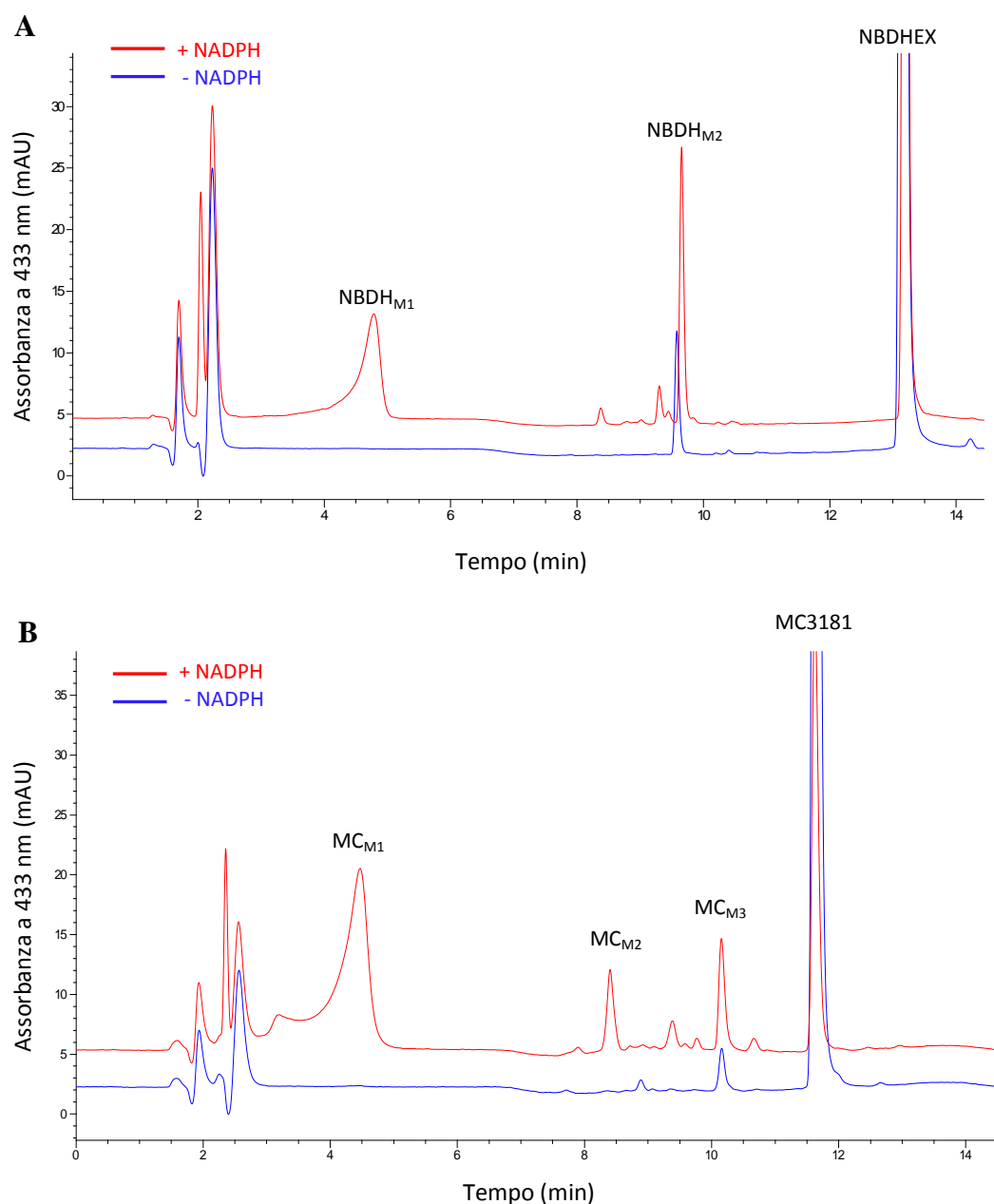


**Figura 21. Struttura chimica del glucuronide dell'NBDHEX**

#### *4.1.2. Caratterizzazione preliminare del metabolismo microsomiale dipendente da nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto (NADPH)*

Esperimenti successivi sono stati condotti allo scopo di valutare, nelle tre specie considerate, la possibile ossidazione dell'NBDHEX e dell'MC3181 da parte di enzimi microsomiali epatici. Ciascuno dei due composti è stato dunque incubato a 37°C per diversi tempi con microsomi epatici sia in assenza sia in presenza del cofattore NADPH, cofattore essenziale ai fini delle ossidazioni mediate da alcuni enzimi microsomiali, *in primis* i CYP (vedi “Introduzione”). Anche in questo caso, come negli esperimenti precedenti, i surnatanti ottenuti dopo deproteinizzazione e successiva centrifugazione dei campioni sono stati analizzati mediante HPLC con rivelazione a 433 nm o LC-DAD-MS/MS, come descritto nella sezione “Materiali e metodi”.

A titolo di esempio, in Figura 22 è riportata una sovrapposizione dei profili cromatografici ottenuti dall'analisi HPLC dei surnatanti di campioni relativi ad incubazione dell'NBDHEX (Figura 22A) o dell'MC3181 (Figura 22B) per 60 minuti con microsomi epatici umani, in assenza e in presenza del cofattore NADPH.



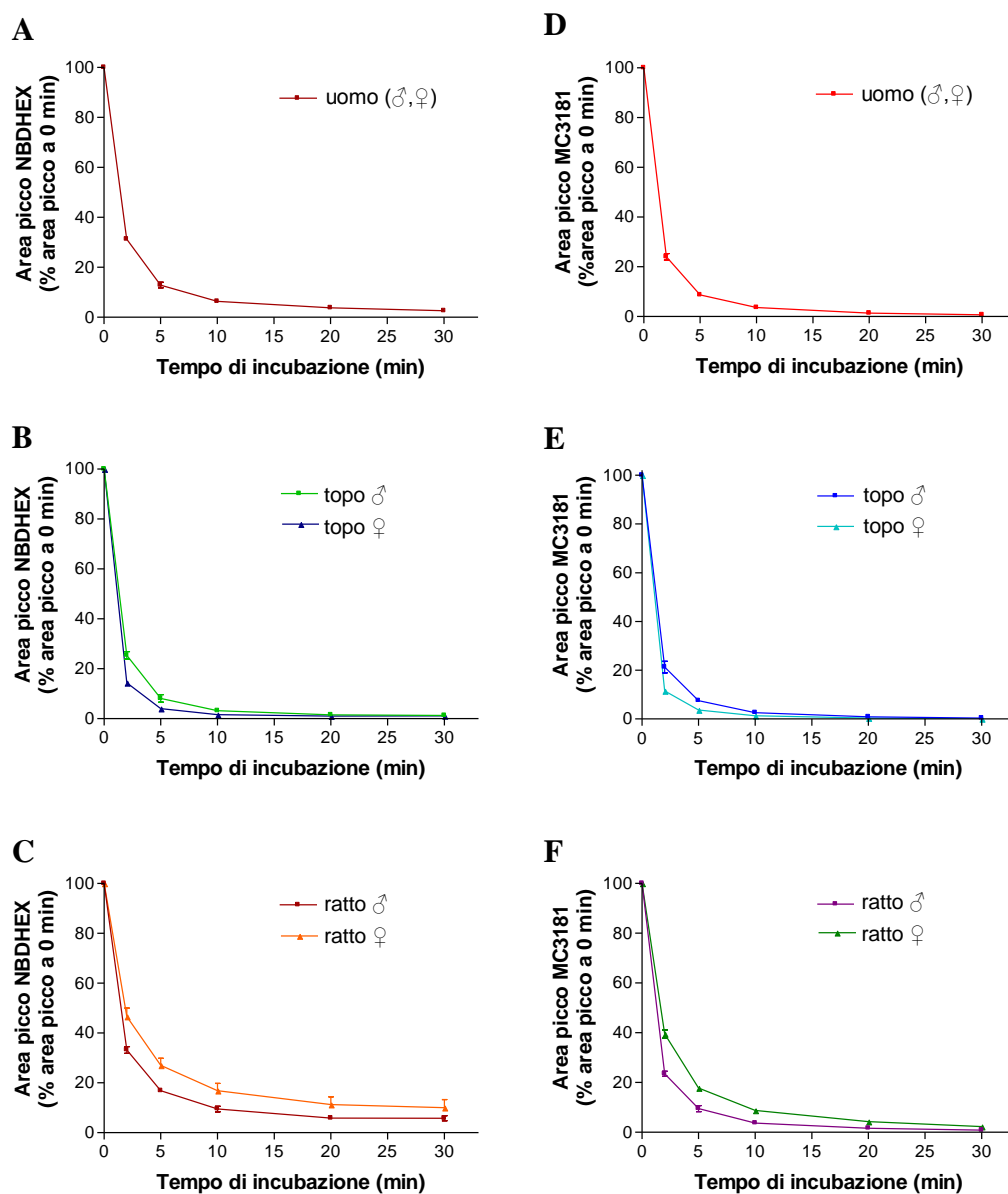
**Figura 22. Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC (rivelazione a  $\lambda = 433$  nm) di surnatanti di miscele di incubazione (37°C; 60 min.) di NBDHEX (50  $\mu$ M; riquadro A) e di MC3181 (50  $\mu$ M; riquadro A) con microsomi epatici umani (0,5 mg proteina/mL), in presenza e in assenza di NADPH (0,5 mM). Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione del campione e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi" (NBDH<sub>M</sub>: metabolita di NBDHEX; MC<sub>M</sub>: metabolita di MC3181).**

Si può notare come i profili cromatografici a 433 nm relativi ai campioni contenenti il NADPH presentino, oltre al picco del substrato residuo (NBDHEX o MC3181), altri due (NBDHEX) o tre (MC3181) picchi principali, uno dei quali relativamente asimmetrico e avente lo stesso  $t_R$  (4,1 min.). E' interessante osservare inoltre come i picchi denominati "NBDH<sub>M2</sub>" e "MC<sub>M3</sub>" siano presenti anche nei campioni contenenti il substrato e i microsomi umani, ma non il NADPH. Ciò suggerisce che tali metaboliti possano formarsi, in parte, per reazione enzimatica non richiedente NADPH.

In Figura 23 sono riassunti i dati relativi all'analisi (mediante HPLC) dell'andamento temporale dei livelli di NBDHEX e MC3181 (espressi in termini di area del rispettivo picco cromatografico normalizzata al valore dell'area del campione "tempo 0") nelle miscele di incubazione contenenti le varie tipologie di microsomi epatici e NADPH. Dal confronto dei grafici emerge come entrambi i composti siano altamente instabili nelle condizioni sperimentali adottate, con emivite di scomparsa relativamente brevi e comprese tra 2,9 minuti (topo femmina) e 10,4 minuti (ratto femmina). Inoltre, non si osservano differenze marcate nella velocità di scomparsa dei due composti dal mezzo di incubazione né in funzione della specie né in funzione del sesso dell'animale.

Anche in questo caso sono state effettuate successive analisi LC-DAD-MS/MS nel tentativo di ottenere informazioni preliminari circa la struttura dei metaboliti che si formano, a partire dai due candidati farmaci, in seguito ad incubazione con microsomi epatici e NADPH.

In Figura 24 sono riportati i risultati relativi all'analisi LC-DAD-MS/MS di un campione ottenuto incubando NBDHEX (50  $\mu$ M) per 60 minuti a 37°C con microsomi epatici umani (0,5 mg proteina/mL) e NADPH (0,5 mM). È importante sottolineare come tutte le analisi LC-DAD-MS/MS siano state effettuate in campioni allestiti incubando l'NBDHEX e l'MC3181 con NADPH e microsomi epatici umani, e che il profilo dei metaboliti osservati potrebbe essere differente rispetto a quello delle altre due specie considerate nel presente studio (ratto e topo). Il profilo cromatografico a 433 nm ottenuto nelle condizioni sperimentali adottate presenta, oltre al picco relativo all'NBDHEX ( $t_R$  = 16 min.), due ulteriori picchi principali, denominati "NBDH<sub>M1</sub>" e "NBDH<sub>M2</sub>" (Figura 24, riquadro A).

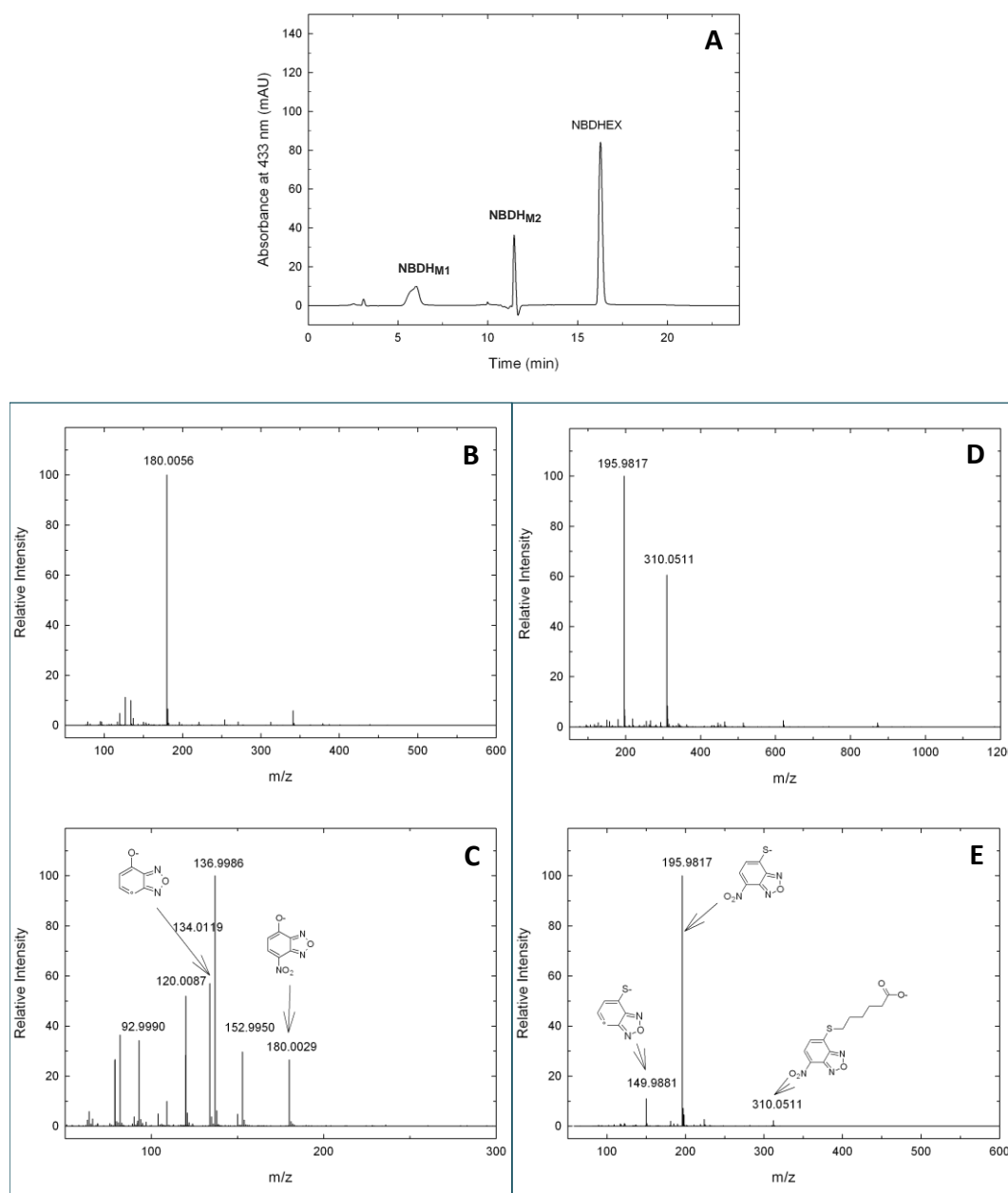


**Figura 23. Stabilità di NBDHEX e MC3181 (10  $\mu$ M) in miscele di incubazione contenenti microsomi epatici (0,5 mg proteina/mL) umani (A e D), murini (B ed E) e di ratto (C e F), e NADPH (0,5 mM). Ciascun valore sperimentale è la media  $\pm$  deviazione standard di  $n = 3$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti. In alcuni casi le dimensioni della barra degli errori sono inferiori a quelle del simbolo.**

Emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di NBDHEX: uomo, 6,7 min.; ratto maschio, 8,6 min.; ratto femmina, 10,4 min.; topo maschio, 5,4 min., e topo femmina, 5,7 min.

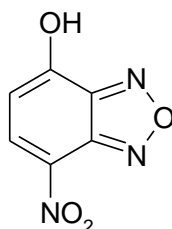
Emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di MC3181: uomo, 4,7 min.; ratto maschio, 5,0 min.; ratto femmina, 6,2 min.; topo maschio, 4,2 min., e topo femmina, 2,9 min.

Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, processazione dei campioni, analisi cromatografica e calcolo del  $t_{1/2}$  sono riportati nella sezione “Materiali e metodi”.

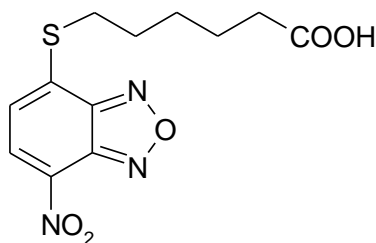


**Figura 24. Analisi LC-DAD-MS/MS del surnatante di una miscela di incubazione (37°C; 60 min.) di NBDHEX (50 µM) con microsomi epatici umani (0,5 mg proteina/mL), in presenza di NADPH (0,5 mM).** A) cromatogramma relativo all'analisi LC-DAD con rivelazione a 433 nm (NBDH<sub>M1</sub> e NBDH<sub>M2</sub>: metaboliti di NBDHEX); B) spettro di massa relativo al picco cromatografico NBDH<sub>M1</sub>; C) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico NBDH<sub>M1</sub>; D) spettro di massa relativo al picco cromatografico NBDH<sub>M2</sub>; E) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico NBDH<sub>M2</sub>. Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione del campione e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".

Lo spettro di massa relativo al picco cromatografico NBDH<sub>M1</sub> (Figura 24, riquadro B) è caratterizzato dalla presenza di uno ione negativo con  $m/z$  pari a 180. Il composto che dà origine al picco NBDH<sub>M1</sub> è quindi una sostanza con massa molecolare pari a 181 Da, la cui possibile struttura è riportata in Figura 25. Il metabolita in questione potrebbe cioè derivare dalla sostituzione della catena laterale dell’NBDHEX con un gruppo ossidrilico. Lo spettro di massa relativo al picco cromatografico denominato NBDH<sub>M2</sub> (Figura 24, riquadro D) si caratterizza, invece, per la presenza di un picco con  $m/z$  pari a 310, indicativo della presenza di uno ione con massa molecolare superiore di 14 Da rispetto allo ione negativo dell’NBDHEX ( $m/z = 296$ ). Tale incremento di massa molecolare è compatibile con l’ossidazione dell’ossidrile alcolico primario della catena laterale del farmaco e la formazione del corrispondente acido carbossilico (struttura in Figura 26). E’ da sottolineare a questo proposito come alcuni farmaci caratterizzati dalla presenza di un gruppo alcolico primario (ad es. l’antipertensivo losartan) siano ossidati nei rispettivi acidi carbossilici mediante l’intervento di enzimi microsomiali CYP [es. Stearn *et al.*, 1995].



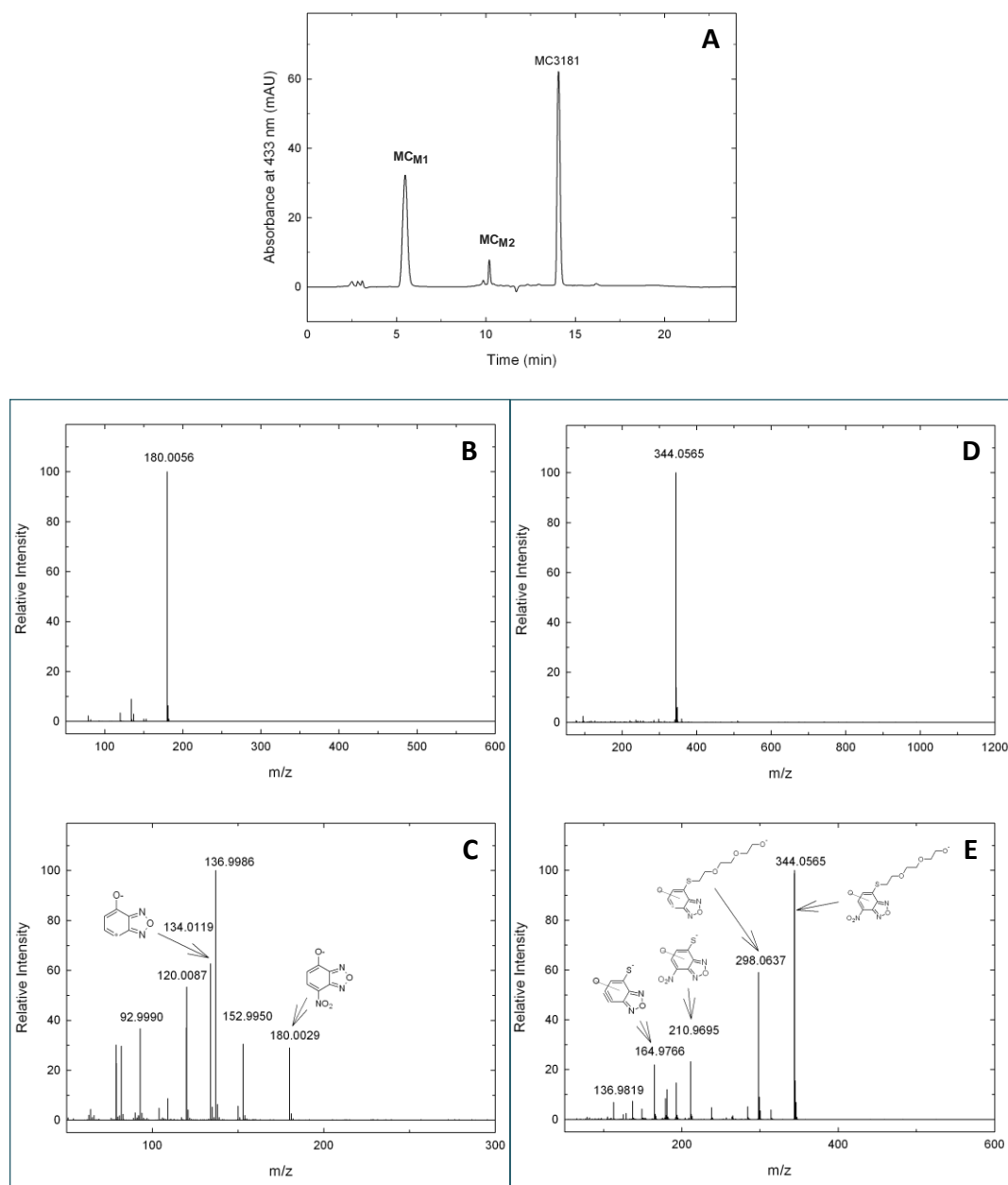
**Figura 25. Ipotetica struttura del metabolita NBDH<sub>M1</sub> e MC<sub>M1</sub>**



**Figura 26. Ipotetica struttura del metabolita NBDH<sub>M2</sub> e M<sub>C</sub>**



In Figura 27 sono riportati i risultati riguardanti l'analisi LC-DAD-MS/MS di un campione ottenuto incubando MC3181 (50  $\mu$ M) per 60 minuti a 37°C con microsomi epatici umani (0,5 mg/mL) in presenza di NADPH (0,5 mM). Come nel caso dell'NBDHEX, anche nel caso dell'MC3181 il cromatogramma a 433 nm si caratterizza per la presenza, oltre che del picco del substrato, di due picchi principali (denominati "MC<sub>M1</sub>" e "MC<sub>M2</sub>") uno dei quali (MC<sub>M1</sub>) caratterizzato da un tempo di ritenzione e da profili degli spettri di massa e di frammentazione (MS/MS) identici a quelli del metabolita dell'NBDHEX denominato NBDH<sub>M1</sub>. In altre parole, MC3181 ed NBDHEX sembrano condividere un metabolita microsomiale, la cui struttura ipotizzata è riportata in Figura 25. Lo spettro di massa relativo al metabolita MC<sub>M2</sub> si caratterizza per la presenza di un picco con  $m/z$  pari a 344, indicativo di uno ione negativo con massa molecolare superiore di 16 Da rispetto allo ione negativo derivante dall'MC3181 ( $m/z = 328$ ; spettro di massa non mostrato). Tale incremento di massa molecolare è compatibile con la formazione di un prodotto di mono-ossigenazione del farmaco.



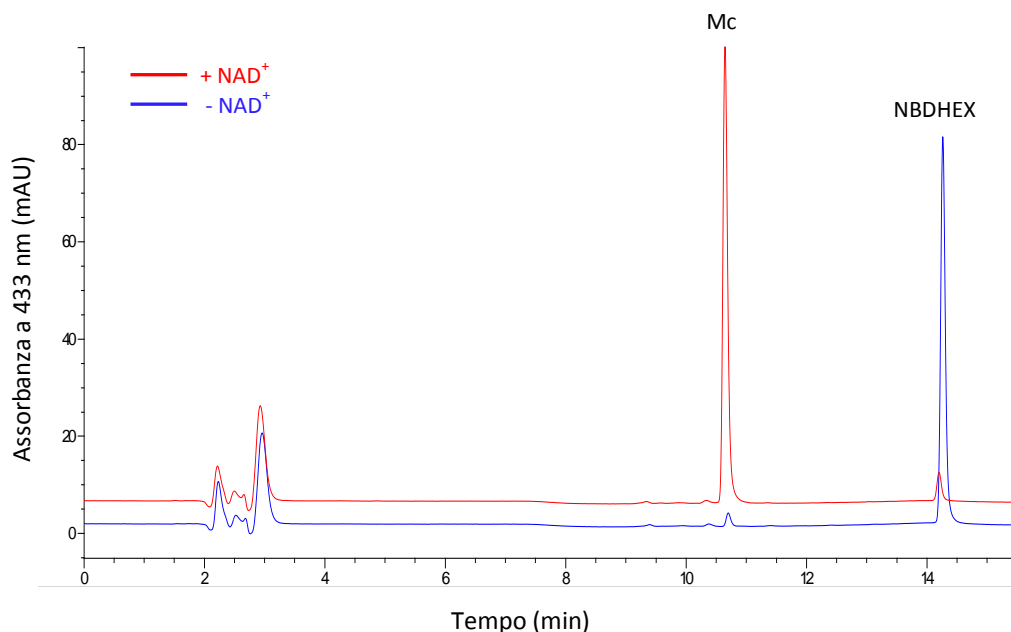
**Figura 27. Analisi LC-DAD-MS/MS del surnatante di una miscela di incubazione (37°C; 60 min.) di MC3181 (50 µM) con microsomi epatici umani (0,5 mg proteina/mL), in presenza di NADPH (0,5 mM). A) Cromatogramma relativo all'analisi LC-DAD con rivelazione a 433 nm (MC<sub>M1</sub> e MC<sub>M2</sub>: metaboliti di MC3181); B) spettro di massa relativo al picco cromatografico MC<sub>M1</sub>; C) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico MC<sub>M1</sub>; D) spettro di massa relativo al picco cromatografico MC<sub>M2</sub>; E) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico MC<sub>M2</sub>. Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione del campione e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".**

#### 4.1.3. Studi di ossidazione mediata da enzimi citosolici dipendenti da nicotinammide adenina dinucleotide ossidato ( $NAD^+$ )

La presenza di un gruppo alcolico primario nella catena laterale di entrambe le molecole dell'NBDHEX e dell'MC3181 rende teoricamente possibile la loro ossidazione nei rispettivi acidi carbossilici, oltre che da parte di enzimi microsomiali della superfamiglia CYP (reazione che sembra effettivamente verificarsi nel solo caso dell'NBDHEX) anche da parte di enzimi citosolici della famiglia delle ADH, con la partecipazione eventuale di enzimi della famiglia delle ALDH. Come detto in precedenza (vedi "Introduzione"), alcune ADH, tra cui le ADH di classe I e II umane, oltre ad essere in grado di catalizzare l'ossidazione di numerosi alcoli primari ( $R-CH_2-OH$ ) nelle corrispondenti aldeidi ( $R-COH$ ) sono anche capaci di catalizzare l'ossidazione di queste ultime nel rispettivo acido carbossilico ( $R-COOH$ ), mimando l'attività delle ALDH [Svensson *et al.*, 1999, e referenze ivi contenute]; in questo senso l'ossidazione di alcoli ad acidi carbossilici può essere anche mediata dal solo enzima ADH, senza l'intervento di ALDH.

La possibile ossidazione di NBDHEX e MC3181 da parte di enzimi citosolici  $NAD^+$ -dipendenti (tra cui si annoverano, appunto, le ADH e alcune ALDH) è stata esaminata mediante incubazione di ciascuno dei due composti a 37°C per tempi diversi con frazioni citosoliche epatiche di diversa origine in presenza e in assenza del cofattore  $NAD^+$ , e analizzando mediante HPLC con rivelazione a 433 nm i surnatanti ottenuti da ciascun campione in seguito a deproteinizzazione e centrifugazione.

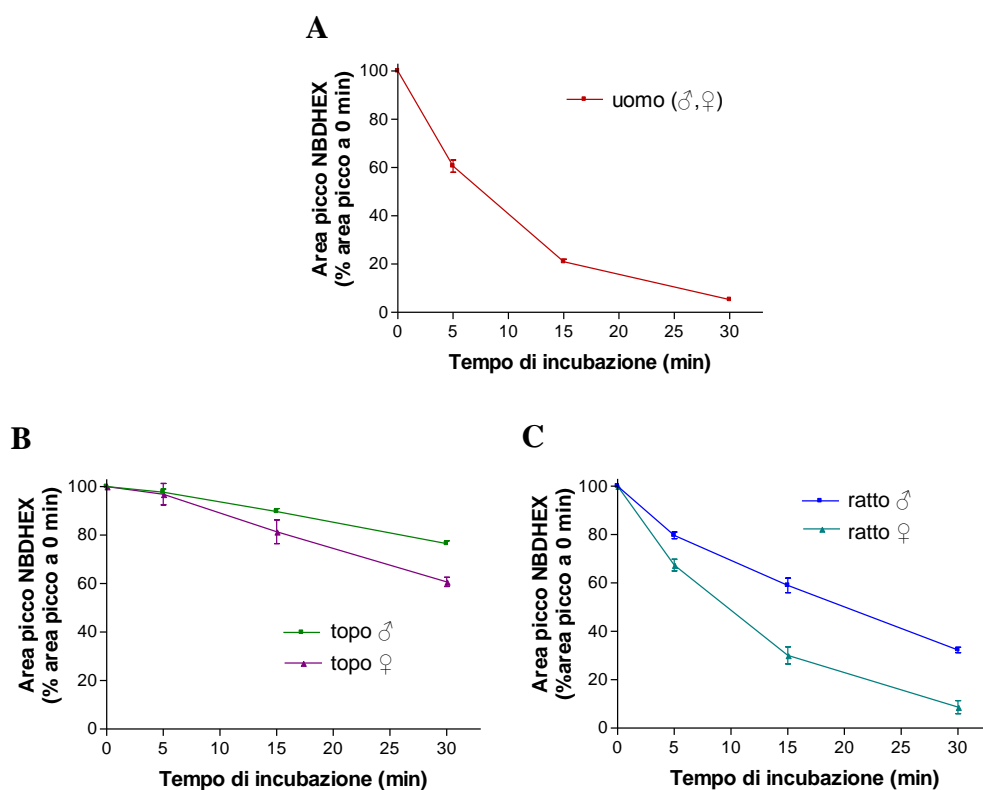
In Figura 28 è riportata, a titolo di esempio, una sovrapposizione dei profili HPLC relativi all'analisi di surnatanti ottenuti incubando l'NBDHEX (10  $\mu M$ ) per 30 minuti con citosol di fegato umano in assenza e in presenza di  $NAD^+$ . Come si può notare, solo il cromatogramma ottenuto dal campione contenente anche il cofattore  $NAD^+$  si caratterizza per la presenza, oltre che del picco tipico dell'NBDHEX ( $t_R = 14,2$  min.), di un picco predominante con  $t_R$  più breve (10,4 min.), indicativo della formazione di un metabolita (denominato " $M_C$ ") la cui sintesi richiede la presenza del cofattore  $NAD^+$ . Risultati qualitativamente simili (presenza di un metabolita con  $t_R = 10,3$  minuti nelle sole miscele di incubazione contenenti  $NAD^+$ ) sono stati ottenuti incubando il farmaco con frazioni citosoliche di fegato di ratto o di topo, maschio o femmina.



**Figura 28.** Cromatogrammi relativi all'analisi HPLC (rivelazione a  $\lambda = 433$  nm) di surnatanti di miscele di incubazione (37°C; 30 min.) di NBDHEX (10  $\mu$ M) con citosol di fegato umano (0,5 mg proteina/mL), in presenza e in assenza di  $\text{NAD}^+$  (1 mM). Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione dei campioni e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi" ( $\text{M}_\text{C}$ : metabolita citosolico di NBDHEX).

Esperimenti analoghi a quelli appena descritti nei quali il substrato era costituito dall'MC3181 hanno evidenziato come questo composto non vada incontro a biotrasformazione quando incubato con le varie tipologie di citosol di fegato e  $\text{NAD}^+$  (risultati non mostrati).

I diagrammi riportati in Figura 29 mostrano l'andamento temporale dei livelli di NBDHEX nelle miscele di incubazione contenenti le varie tipologie di frazioni citosoliche epatiche e  $\text{NAD}^+$ . Si può osservare come l'NBDHEX sia risultato essere relativamente instabile quando incubato con citosol di fegato umano e di ratto ( $t_{1/2}$  pari a 8,6 min. e 18,8 min., rispettivamente per ratto femmina e maschio), mentre i livelli del farmaco decadono con relativa lentezza negli incubati contenenti  $\text{NAD}^+$  e citosol di topo (il 76,5% e il 60,7% del substrato era ancora presente nel mezzo di reazione dopo 30 minuti di incubazione, rispettivamente nel maschio e nella femmina). Tali dati suggeriscono dunque l'esistenza non solo di differenze interspecie nel metabolismo ossidativo citosolico dell'NBDHEX, ma anche, per quanto riguarda il ratto, di differenze marcate tra i due sessi ( $t_{1/2} = 18,8$  e 8,6 min., rispettivamente nel ratto maschio e nella femmina).

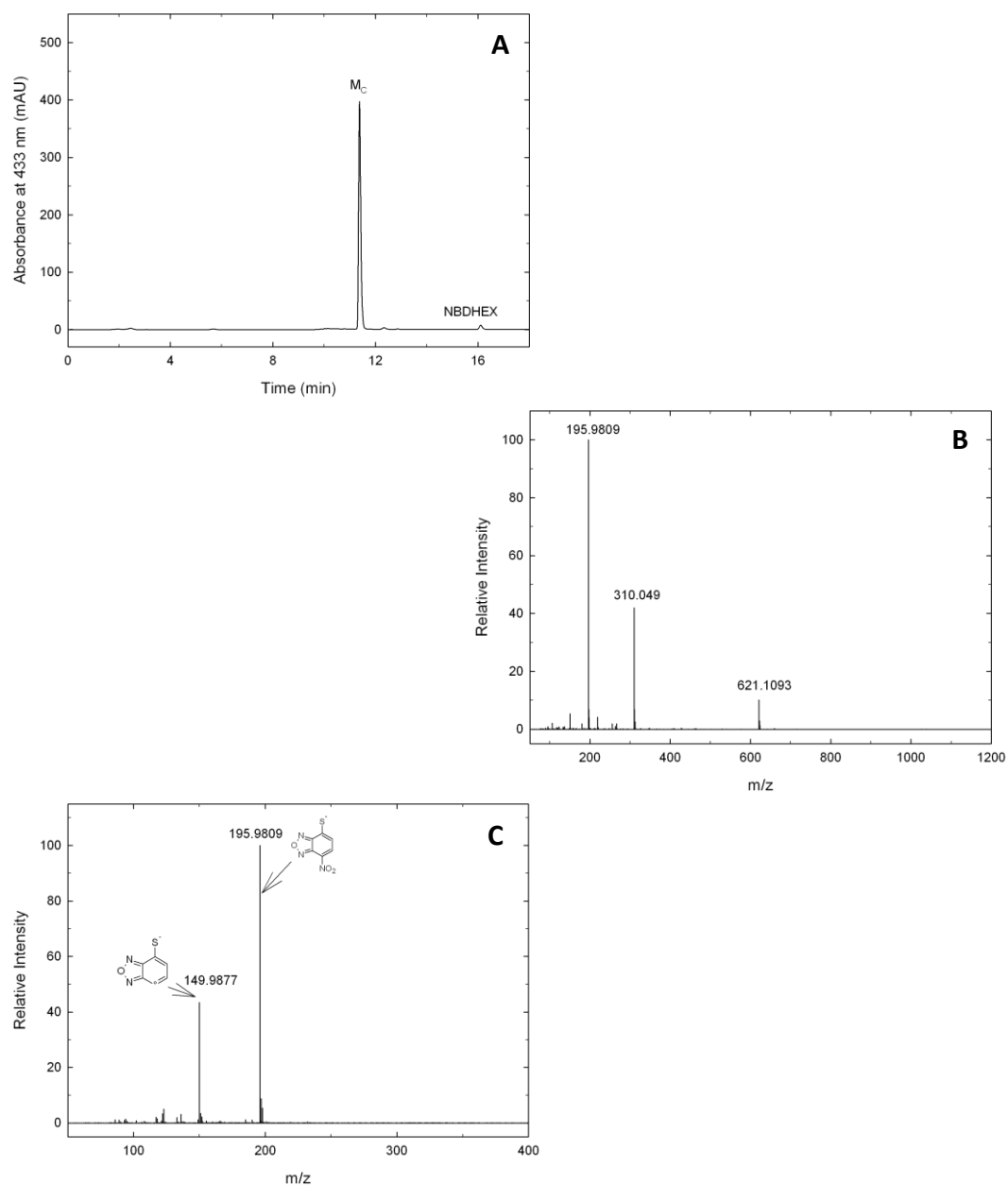


**Figura 29. Stabilità di NBDHEX (10  $\mu$ M) in miscele di incubazione contenenti citosol di fegato (0,5 mg proteina/mL) umano (A), di topo (B) e di ratto (C), e  $\text{NAD}^+$  (1 mM). Ciascun valore sperimentale è la media  $\pm$  deviazione standard di  $n = 3$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti. In alcuni casi le dimensioni delle barre degli errori sono inferiori a quelle del simbolo.**

Emivita di scomparsa ( $t_{1/2}$ ) di NBDHEX: uomo, 7,0 min.; ratto maschio, 18,8 min.; ratto femmina, 8,6 min.; topo maschio, 76,2 min., e topo femmina, 40,3 min.

Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, processazione dei campioni, analisi cromatografica e calcolo del  $t_{1/2}$  sono riportati nella sezione “Materiali e metodi”.

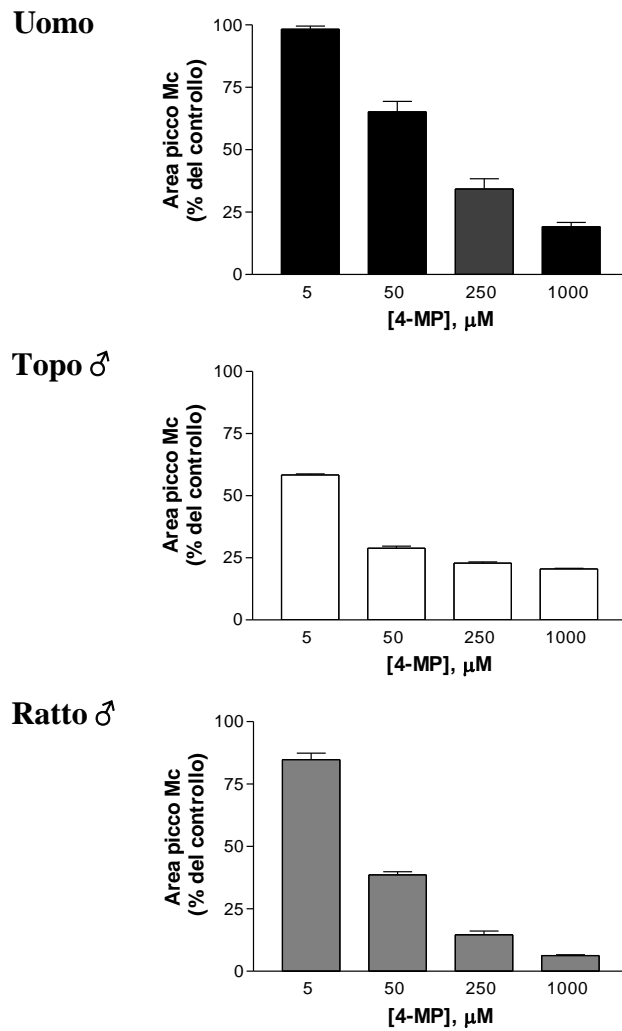
Al fine di ottenere informazioni preliminari circa la struttura del metabolita citosolico ( $M_C$ ) dell’NBDHEX, il farmaco (50  $\mu$ M) è stato incubato a 37°C con citosol di fegato umano (0,5 mg/mL) e  $\text{NAD}^+$  (1 mM) per 120 minuti, e il surnatante ottenuto da tale campione in seguito a deproteinizzazione e centrifugazione è stato sottoposto parallelamente sia ad analisi HPLC sia ad analisi LC-DAD-MS/MS; i risultati relativi all’analisi LC-DAD-MS/MS sono riportati in Figura 30.



**Figura 30. Analisi LC-DAD-MS/MS del surnatante di una miscela di incubazione (37°C; 120 min.) di NBDHEX (50  $\mu$ M) con citosol di fegato umano (0,5 mg proteina/mL), in presenza di  $NAD^+$  (1 mM). A) cromatogramma relativo all'analisi LC-DAD con rivelazione a 433 nm ( $M_C$ : metabolita citosolico di NBDHEX); B) spettro di massa relativo al picco cromatografico  $M_C$ ; C) spettro massa-massa (MS/MS) relativo al picco cromatografico  $M_C$ . Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione del campione e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".**

Anche in questo caso, così come nel caso delle analisi HPLC, il tracciato cromatografico a 433 nm è caratterizzato dalla presenza, oltre che del picco dell'NBDHEX, di un secondo picco predominante, con  $t_R$  pari a 11,8 minuti. Va precisato che i composti (ossia l'NBDHEX e il suo metabolita) presentano, in questo caso,  $t_R$  profondamente diversi da quelli osservati nel caso delle analisi HPLC; ciò a causa delle diverse condizioni cromatografiche adottate. Lo spettro di massa del picco  $M_C$  (Figura 30, riquadro B) si caratterizza per la presenza di uno ione negativo con  $m/z$  pari a 310, ossia uno ione con il medesimo  $m/z$  del metabolita microsomiale del farmaco denominato  $NBDH_{M2}$ . I due metaboliti sono inoltre caratterizzati da un analogo profilo di frammentazione (presenza, nello spettro MS/MS, di ioni con  $m/z = 150$  e  $196$ ; Figura 30, riquadro C). I dati dell'analisi LC-DAD-MS/MS suggeriscono quindi che il metabolita  $M_C$ , analogamente al metabolita microsomiale  $NBDH_{M2}$ , sia un composto con peso molecolare pari a 311 Da e potrebbe pertanto essere rappresentato dall'acido carbossilico derivante dall'ossidazione del gruppo alcolico della catena laterale dell'NBDHEX (Figura 26).

In un ultimo gruppo di esperimenti si è voluto valutare il possibile ruolo di enzimi della famiglia ADH nella formazione del metabolita  $M_C$ . A tal fine, l'NBDHEX (10  $\mu M$ ) è stato incubato a 37°C per 30 minuti con citosol di fegato umano, di topo maschio o di ratto maschio (0,5 mg di proteina totale/mL) in presenza di  $NAD^+$  (1 mM) e in presenza o in assenza (controllo) di concentrazioni scalari (5-1000  $\mu M$ ) di 4-metilpirazolo (4-MP), un inibitore reversibile competitivo relativamente selettivo delle ADH di classe I [Parkinson e Ogilvie, 2010]. I surnatanti ottenuti in seguito a deproteinizzazione e centrifugazione dei campioni sono stati analizzati mediante HPLC, così da valutare il contenuto relativo di  $M_C$  in termini di area del rispettivo picco cromatografico. I dati riportati in Figura 31 dimostrano come la formazione di  $M_C$  risulti inibita in modo concentrazione-dipendente dalla presenza nel mezzo di reazione del 4-MP. Le ADH di classe I sembrano dunque essere coinvolte nella biotrasformazione di NBDHEX nel suo metabolita  $M_C$ .



**Figura 31. Effetto inibitorio del 4-metilpirazolo (4-MP), un inibitore di ADH, sulla formazione del metabolita citosolico ( $M_C$ ) dell'NBDHEX.** La concentrazione di NBDHEX nel mezzo di incubazione era pari a 10  $\mu\text{M}$ . Ciascun valore è la media  $\pm$  deviazione standard di  $n = 3$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti. Ulteriori dettagli relativi alle condizioni di incubazione, di processazione dei campioni e di analisi cromatografica sono riportati nella sezione “Materiali e metodi”.

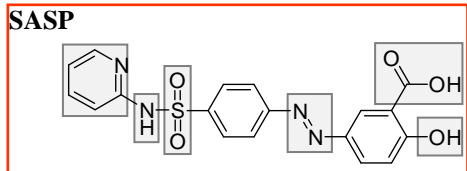
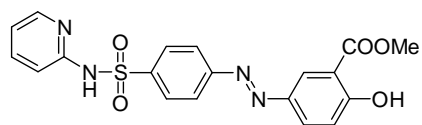
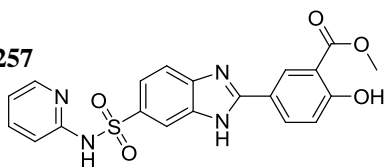
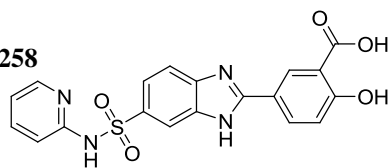
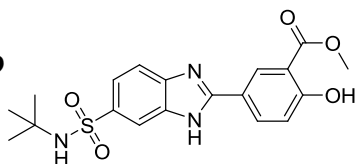
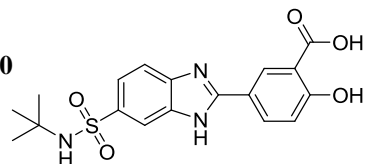
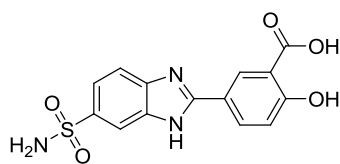
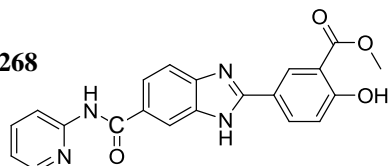
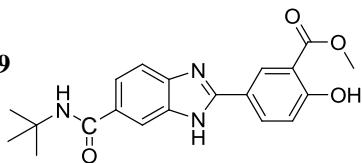
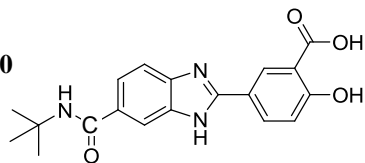
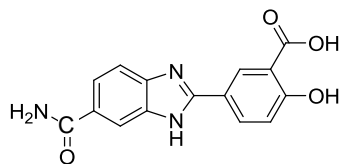
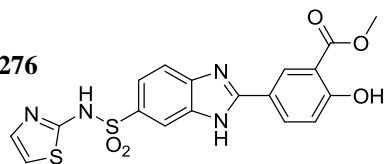
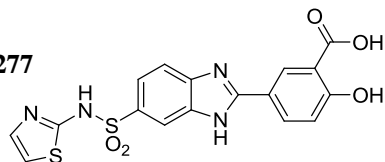
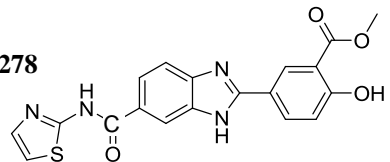
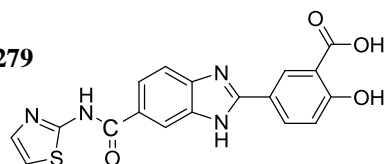
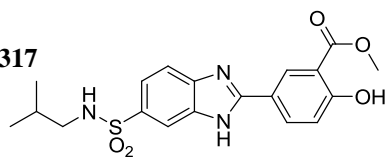


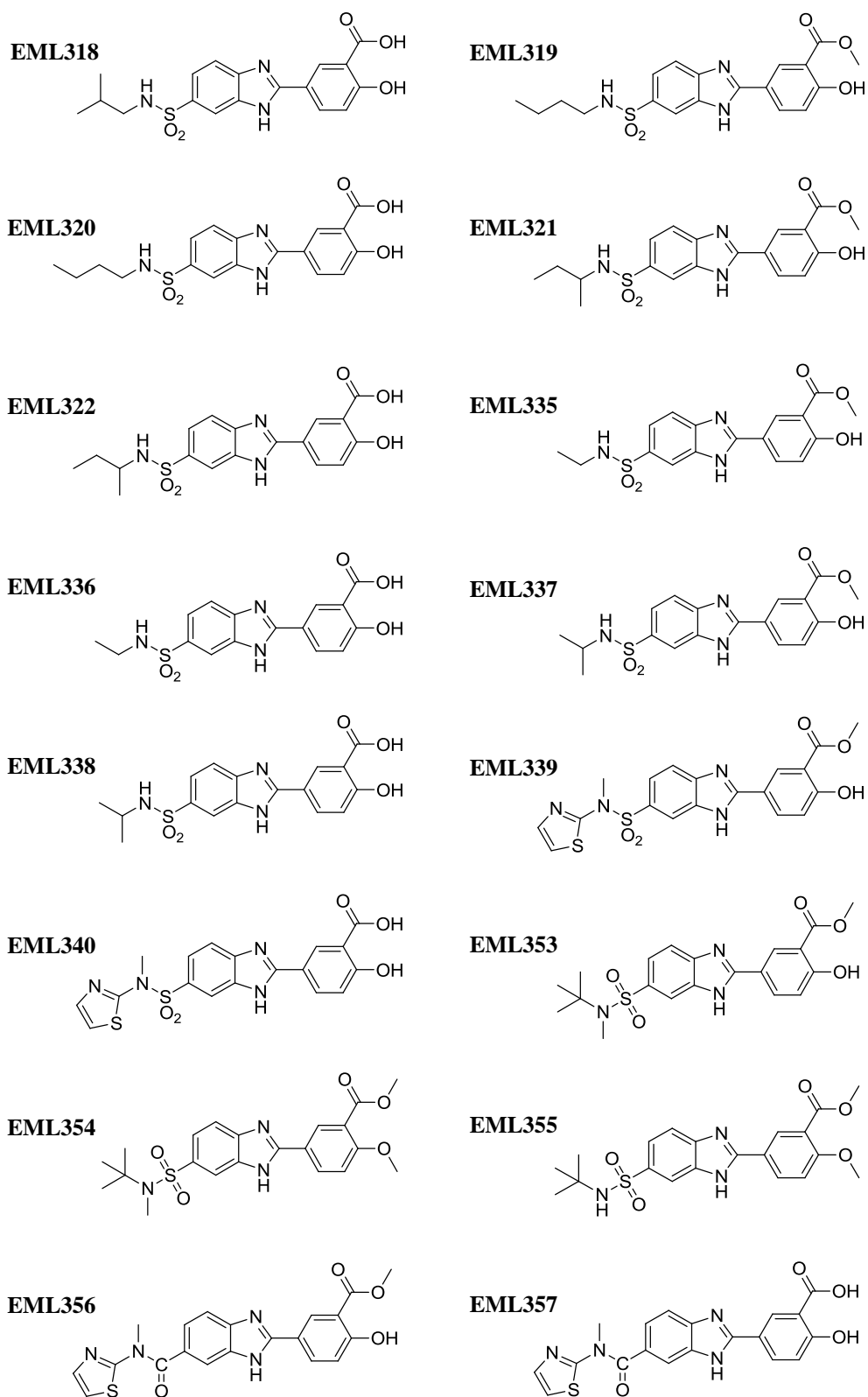
## **4.2. Caratterizzazione *in vitro* di analoghi strutturali della sulfasalazina quali inibitori della glutatione trasferasi P1-1 umana**

Una seconda parte dell'attività svolta nell'ambito del Dottorato di Ricerca ha riguardato la valutazione *in vitro* di nuovi analoghi strutturali del farmaco sulfasalazina (salicilazosulfapiridina, SASP) quali potenziali inibitori della glutatione trasferasi (glutazione S-trasferasi, GST) P1-1 umana. Tutti gli analoghi strutturali della SASP studiati si caratterizzano per la sostituzione del legame azoico con un anello imidazolico (derivati benzimidazolici). Ulteriori modifiche apportate alla struttura della SASP consistono in: a) sostituzione dell'anello piridinico con un differente anello eterociclico, con una catena alifatica o con un atomo di idrogeno; b) sostituzione del gruppo solfonico con un gruppo carbonilico; c) sostituzione del gruppo carbossilico libero con un gruppo estere metilico; d) metilazione dell'atomo di azoto sulfonammidico; e) esterificazione dell'ossidril fenolico con metanolo. E' stato esaminato anche l'analogo della SASP ottenuto per sola sostituzione del gruppo carbossilico libero con un gruppo estere metilico. Le strutture della SASP, del corrispondente estere metilico e dei derivati benzimidazolici in analisi (nel totale 30), denominati utilizzando la sigla "EML" seguita da un numero di 3 cifre, sono riportate in Figura 32.

### **4.2.1. Valutazione dell'effetto inibitorio sull'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana**

In una prima serie di esperimenti, si è voluto valutare l'effetto inibitorio della SASP, del rispettivo estere metilico e dei 30 derivati benzimidazolici, sull'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana. La preparazione utilizzata dovrebbe contenere principalmente la forma GSTP1-1, in quanto quest'ultima rappresenta il 90% delle GST citosoliche del tessuto placentare [Turella *et al.*, 2003]. Tale valutazione è stata effettuata tramite l'utilizzo di un substrato *marker* dell'attività coniugativa di GST, l'1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (vedi Figura 2 in "Introduzione"; Habig *et al.*, 1974), e identificando e quantificando il prodotto della sua coniugazione al GSH (S-glutationil-2,4-dinitrobenzene, GS-DNB) mediante HPLC.

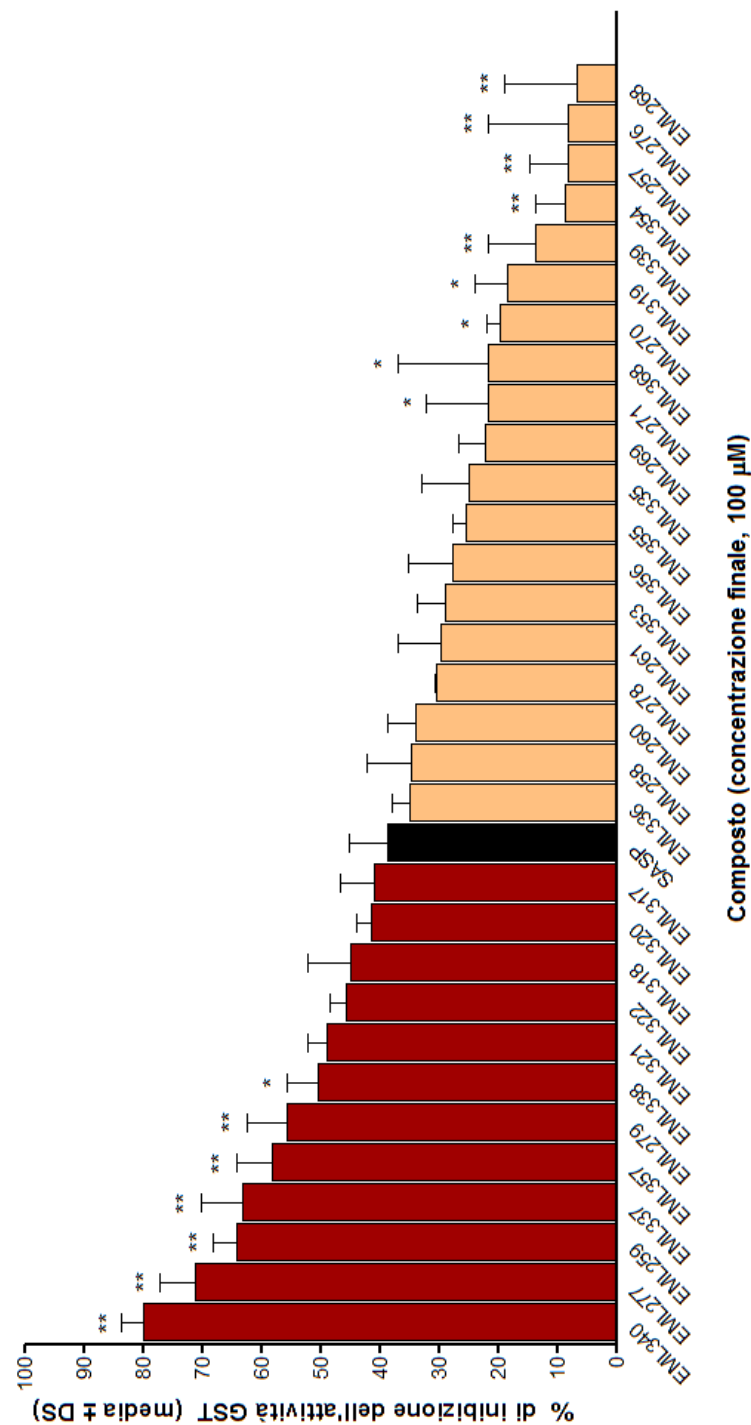
**SASP****Estere SASP (EML368)****EML257****EML258****EML259****EML260****EML261****EML268****EML269****EML270****EML271****EML276****EML277****EML278****EML279****EML317**



**Figura 32. Struttura della SASP e dei suoi analoghi strutturali esaminati nello studio.** Nella struttura della SASP sono evidenziate le regioni della molecola oggetto di variazioni strutturali.

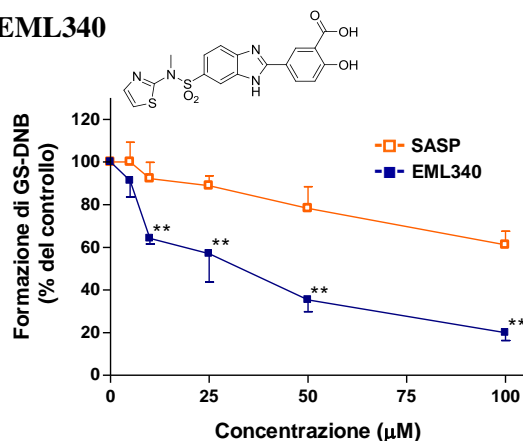
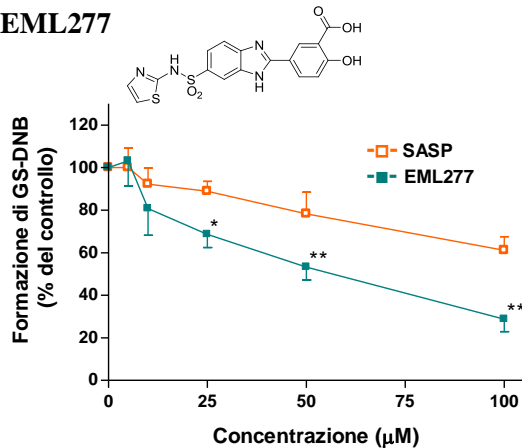
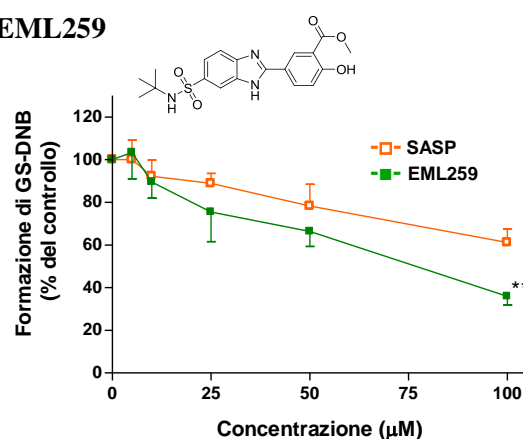
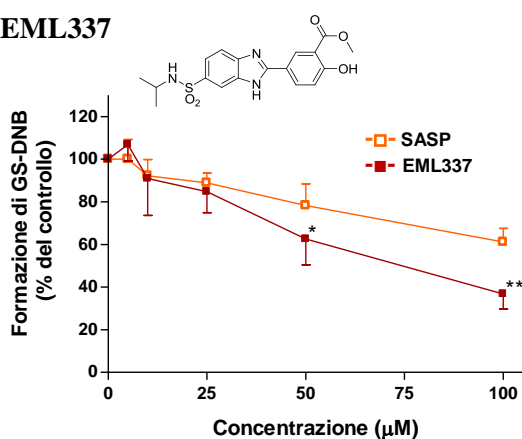
Tale metodo, precedentemente messo a punto nel nostro laboratorio, ha permesso l'identificazione e la quantificazione del GS-DNB anche in presenza della SASP e dei suoi analoghi in esame, nonostante alcuni di essi presentassero un significativo assorbimento alla lunghezza d'onda del massimo di assorbimento del GS-DNB (340 nm). Nessuno dei composti analizzati presentava infatti  $t_R$  analogo a quello del GS-DNB ( $t_R = 5,8$  min.).

Nel diagramma di Figura 33 sono riportate le percentuali di inibizione dell'attività coniugativa della GST di placenta della SASP (barra in nero) e di tutti gli analoghi strutturali studiati, alla concentrazione massima testata, ossia 100  $\mu$ M. Come si può osservare, 7 dei 30 analoghi benzimidazolici studiati (EML340, EML277, EML259, EML337, EML357, EML279, ed EML338) dimostrano un effetto inibitorio nei confronti dell'attività catalitica dell'enzima significativamente superiore (inibizione pari rispettivamente a 80,0%, 71,2%, 64,1%, 63,2%, 58,2%, 55,8% e 50,5%) a quello della SASP (inibizione del 38,8%). La presenza di un certo numero di derivati benzimidazolici con maggior effetto inibitorio rispetto alla SASP, indica che il legame azoico non è essenziale ai fini dell'attività inibitoria. L'assenza di tale legame potrebbe conferire alle molecole un vantaggio farmacocinetico significativo, poiché è noto che la scissione della SASP a livello del legame azoico conduce alla formazione di prodotti (sulfapiridina e acido 5-aminosalicilico) con attività inibitoria nei confronti delle GST nettamente inferiore a quella della molecola madre [Ahmad *et al.*, 1992]. Anche la presenza dell'anello piridinico non è risultato necessario per l'attività inibitoria; è anzi interessante notare come i quattro composti dimostratisi gli inibitori più potenti siano caratterizzati dalla sostituzione dell'anello piridinico con un anello tiazolico (EML340 ed EML277) o una catena idrocarburica alifatica ramificata terz-butilica (EML259) o isopropilica (EML337) (Figure 32 e 33). E' altresì interessante osservare come EML340 ed EML277 esercitino un effetto inibitorio sull'attività enzimatica (valutata in termini di produzione di GS-DNB) significativamente superiore a quello della SASP oltre che alla concentrazione 100  $\mu$ M, anche alle concentrazioni 50 e 25  $\mu$ M (Figura 34). Va infine sottolineato come EML340 sia l'unico tra i composti studiati ad inibire sensibilmente l'attività GST anche alla concentrazione 10  $\mu$ M (-35,8%; Figura 34).



**Figura 33. Inibizione dell'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana da parte della SASP e dei suoi analoghi strutturali.** La concentrazione finale di ciascun composto nel mezzo di reazione era pari a 100 µM. Il procedimento sperimentale adottato per l'analisi dell'attività GST è riportato in dettaglio nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun valore è la media ± deviazione standard di  $n = 3-7$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti.

\*\*  $P < 0,01$  vs SASP; \*  $P < 0,05$  vs SASP

**EML340****EML277****EML259****EML337**

**Figura 34. Effetto inibitorio dei composti EML340, EML277, EML259 ed EML337 sull'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana. Ciascun diagramma riporta, a fini comparativi, anche la curva concentrazione-effetto relativa alla SASP. Il procedimento sperimentale adottato per l'analisi della formazione di GS-DNB è riportato in dettaglio nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun valore è la media  $\pm$  deviazione standard di  $n = 3-5$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti.**

**\*\* $P < 0,01$  vs SASP; \* $P < 0,05$  vs SASP**

Per quanto riguarda le altre modifiche strutturali apportate alla molecola della SASP, i risultati riassunti nel diagramma di Figura 33 dimostrano come:

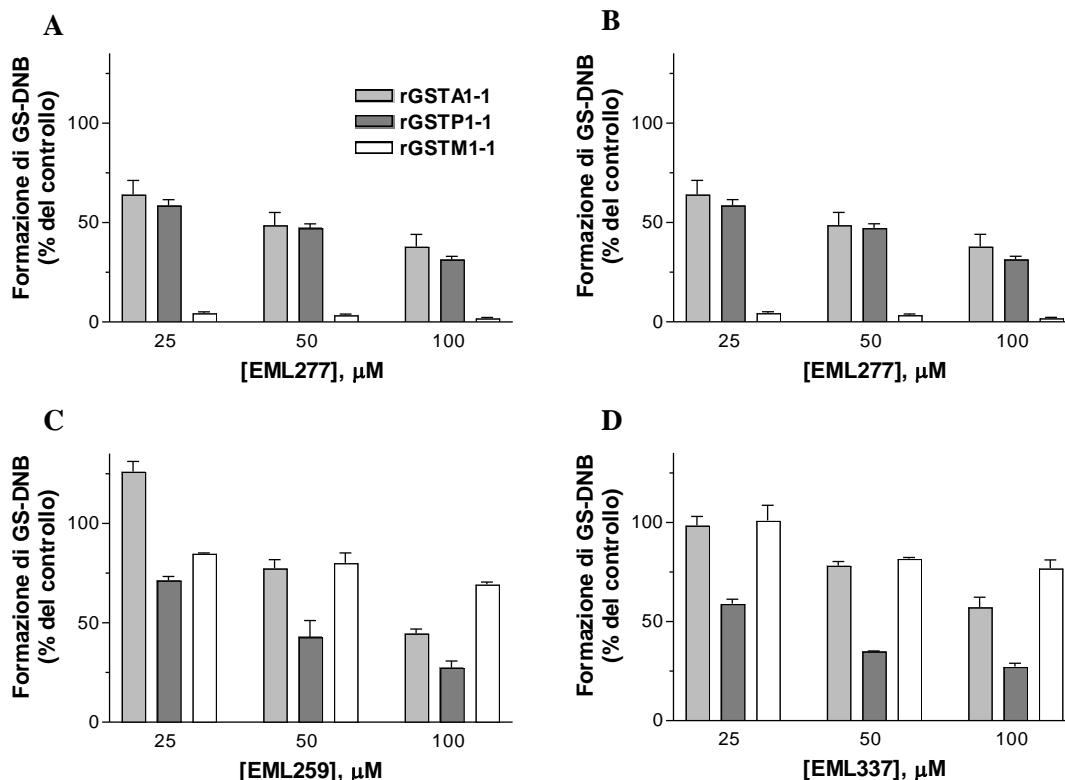
a) la sostituzione del gruppo solfonico con un gruppo carbonilico provochi, per lo più, una diminuzione dell'effetto inibitorio dei composti, a volte di grande entità (e.g. EML259 vs EML269: 64,1% vs 22,3%), a volte di minor entità (e.g. EML260 vs EML270: 33,9% vs 19,6%). Tuttavia, si può in qualche caso notare anche un aumento dell'effetto inibitorio (e.g. EML276 vs EML278: 8,1 % vs 30,5%), oppure non si osservano variazioni significative (e.g. EML257 vs EML268: 8,1% vs 6,8%);

- b) la sostituzione del gruppo carbossilico libero con un gruppo estere metilico determini una riduzione o nessuna variazione importante dell'attività inibitoria. Di particolare interesse è la riduzione dell'attività inibitoria degli acidi carbossilici EML340 ed EML277 (% di inibizione pari rispettivamente a 80,0% e 71,2%) quando esterificati a EML339 ed EML276 (% di inibizione pari rispettivamente a 13,6% e 8,1%). Fa eccezione la coppia di composti EML260-EML259, nella quale l'estere metilico EML259 dimostra effetto inibitorio maggiore del corrispondente acido carbossilico EML260 (% di inibizione pari rispettivamente a 64,1% e 33,9%);
- c) la metilazione dell'atomo di azoto sulfonamidico non conduca a cambiamenti sostanziali dell'effetto inibitorio dei composti; fanno eccezione le coppie EML355-EML354 ed EML259-EML353, nelle quali la metilazione dell'azoto sulfonamidico determina una riduzione dell'attività inibitoria. Ciò si osserva soprattutto nella seconda delle due coppie: in seguito a metilazione, la % di inibizione dell'attività coniugativa del composto EML259, alla concentrazione di 100  $\mu$ M, cala da 64,1% a 28,9%;
- d) la metilazione dell'ossidril fenolico provochi una diminuzione dell'effetto inibitorio dei composti, come si può dedurre dalle % di inibizione dell'attività coniugativa relative alle coppie di analoghi EML259-EML355 (64,1% e 25,5%), ed EML353-EML354 (28,9% e 8,8%).

#### *4.2.2. Valutazione della selettività d'azione nei confronti di proteine GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1 umane ricombinanti*

Sulla base dei risultati ottenuti, una successiva serie di esperimenti ha avuto, quale obiettivo, l'analisi della selettività d'azione (relativamente ad alcune tra le principali GST umane; Dhanani e Awasthi, 2007) dei composti EML340, EML277, EML259, ed EML337. Tale analisi è stata condotta utilizzando, in saggi di inibizione dell'attività enzimatica di coniugazione del CDNB al GSH, gli enzimi umani ricombinanti GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1. Sulla base dei risultati dei precedenti esperimenti, le concentrazioni finali considerate dei quattro composti erano pari a 25, 50 e 100  $\mu$ M. I risultati ottenuti sono riassunti in Figura 35.

Si può innanzitutto constatare che tutti e quattro i composti considerati inibiscono l'attività coniugativa della forma GSTP1-1 di almeno il 60%, alla massima concentrazione testata, pari a 100  $\mu$ M: tale dato supporta quanto osservato precedentemente nei confronti della GST isolata da placenta umana (Figura 33).



**Figura 35.** Effetto inibitorio dei composti EML340, EML277, EML259 ed EML337 sull'attività coniugativa delle proteine umane ricombinanti GSTA1-1, GSTM1-1 e GSTP1-1. Il procedimento sperimentale adottato per l'analisi della formazione di GS-DNB è riportato in dettaglio nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun valore è la media  $\pm$  deviazione standard di  $n = 3$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti.

E' interessante notare come entrambi i composti a nucleo tiazolico (EML340 ed EML277), si siano dimostrati, nei saggi condotti, degli inibitori preferenziali dell'attività dell'enzima GSTM1-1, nei confronti del quale mostrano un effetto inibitorio superiore al 90% a tutte le concentrazioni saggate ( riquadri A e B, Figura 35). Inoltre, EML340, ma non EML277, sembra inibire preferenzialmente la forma GSTP1-1 rispetto alla forma GSTA1-1. I risultati ottenuti suggeriscono infine che EML337 sia l'unico tra i composti analizzati ad inibire, a tutte le concentrazioni considerate, preferenzialmente l'enzima GSTP1-1 ( riquadro D, Figura 35).

#### 4.2.3. Studi di citotossicità in vitro

Sulla base dei risultati ottenuti nello *screening* di inibizione dell'attività della GST placentare, i composti più attivi, ossia gli acidi carbossilici EML340, EML277, EML279, e gli esteri metilici EML259 ed EML337, sono stati sottoposti ad un ulteriore studio preliminare volto a valutarne l'eventuale tossicità nei



confronti di cellule tumorali in coltura. Come riportato nell'introduzione, alcuni inibitori dell'attività catalitica della GSTP1-1 sono infatti in grado di provocare la dissociazione del complesso GSTP1-1-JNK e di indurre, di conseguenza, apoptosi (vedi ad es. De Luca *et al.*, 2014).

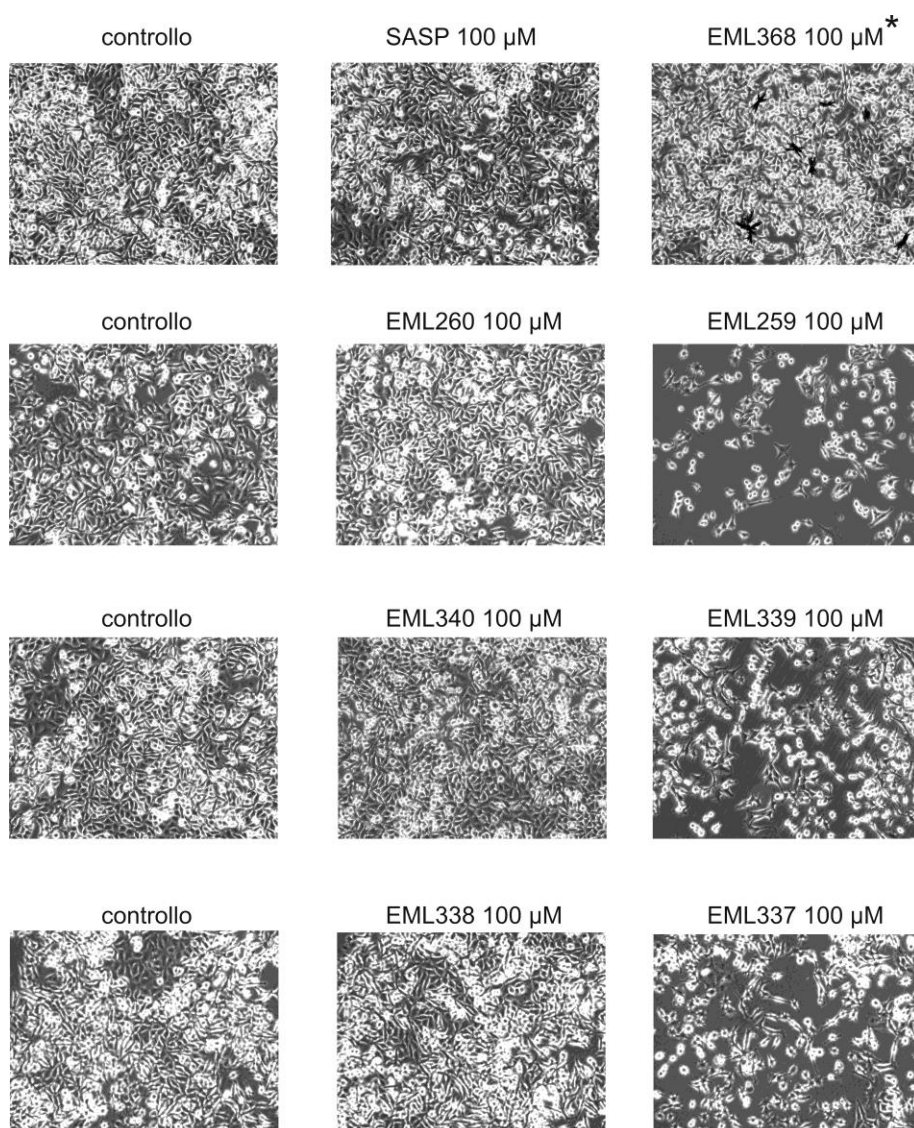
Nello studio di citotossicità sono stati anche inclusi alcuni composti risultati relativamente inattivi nello *screening* di inibizione dell'attività enzimatica, precisamente essi sono:

- gli esteri metilici dei tre acidi considerati (rispettivamente EML339, EML276, ed EML278), partendo dal presupposto che essi potrebbero comportarsi da *prodrug* dei rispettivi acidi carbossilici attivati da esterasi;
- gli acidi carbossilici degli esteri EML259 ed EML337 (rispettivamente EML260 ed EML338);
- il composto EML353, ottenuto a partire da EML259 per esterificazione dell'ossidride fenolica, la SASP e il rispettivo estere metilico (EML368).

Tutti gli esperimenti di citotossicità sono stati effettuati presso l'Istituto Oncologico Veneto di Padova nel laboratorio diretto dalla Dott.ssa D. Saggioro utilizzando, quale bersaglio cellulare, le linee di melanoma umano A375 e SK-MEL 23, entrambe esprimenti elevati livelli di GSTP1-1 [Depeille *et al.*, 2005; Hoey *et al.*, 2009]. La valutazione dell'effetto citotossico (e/o citostatico) è stata inizialmente effettuata coltivando la linea A375 per 48 ore (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) in assenza (controllo) e in presenza di ciascuno dei composti selezionati alla concentrazione finale di 50 e/o 100 µM. Solamente i composti EML259, EML337 ed EML339 si sono dimostrati in grado di interferire, alla massima concentrazione testata (100 µM), con la crescita della linea A375 (Figure 36 e 37). In particolare, dopo 48 ore di trattamento con i tre composti, è stata osservata una crescita cellulare pari rispettivamente al 55,2%, 64,2% e 70,5% del controllo (Figura 37). E' interessante notare come tutti e tre i composti risultati attivi abbiano la struttura di esteri metilici. I corrispondenti acidi carbossilici (EML260, EML338, ed EML340), così come la SASP e il rispettivo estere metilico (Figure 36 e 37), e gli altri analoghi testati (risultati non mostrati) non sono apparsi invece in grado di interferire con la crescita delle cellule A375. Nel caso dell'estere della SASP (EML368), è stata inoltre osservata la formazione di precipitati, dovuta probabilmente alla ridotta solubilità del composto nel terreno di coltura.

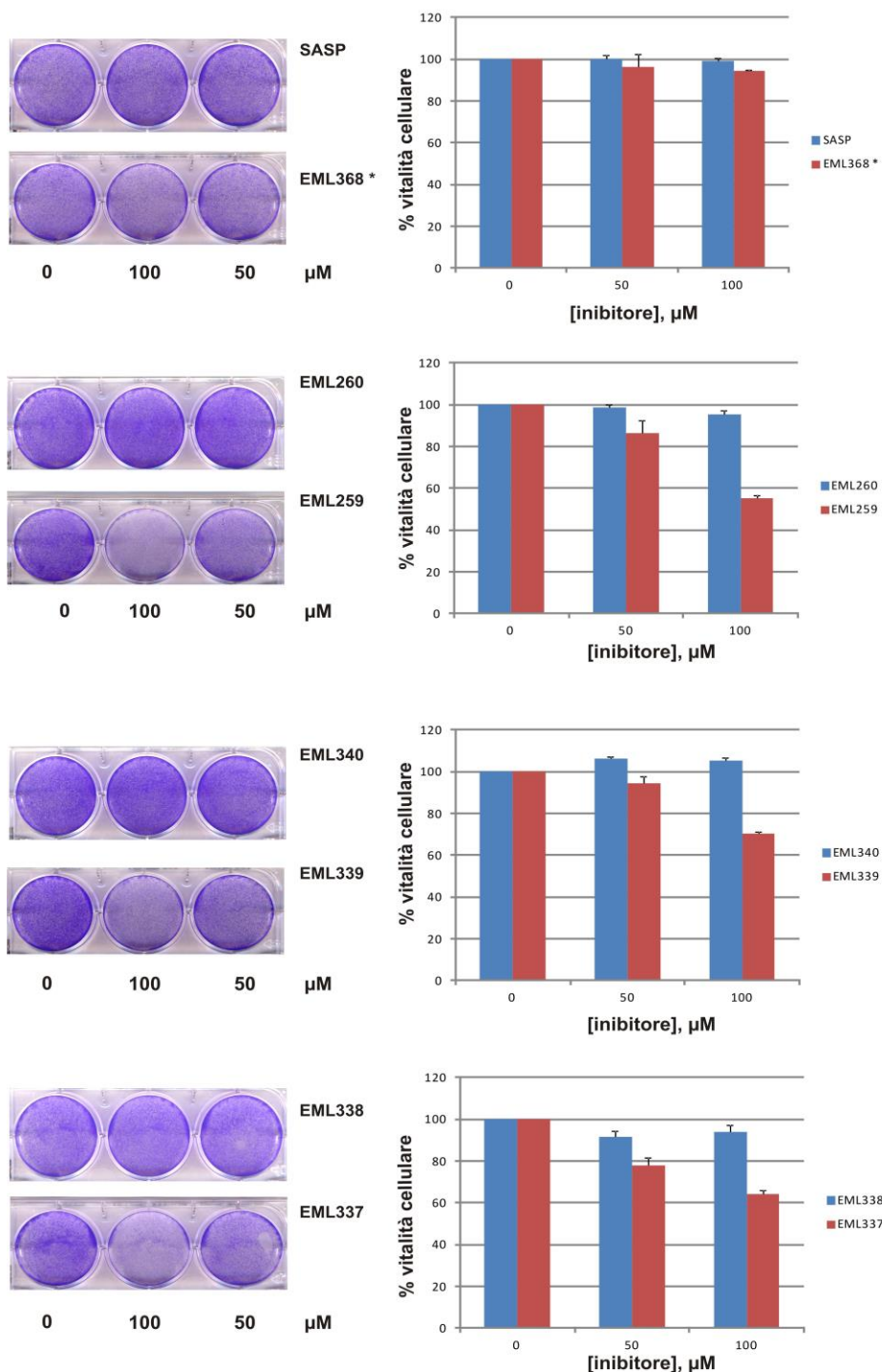
E' possibile che gli esteri metilici EML259, EML337, ed EML339, essendo caratterizzati da maggior lipofilia rispetto ai rispettivi acidi carbossilici, raggiungano più facilmente di questi ultimi il bersaglio intracellulare grazie a un

più facile attraversamento della membrana cellulare. E' inoltre probabile che, come sopra accennato, una volta all'interno delle cellule, tali esteri metilici vengano scissi nei corrispondenti acidi carbossilici (EML260, EML338, ed EML340), per azione di esterasi cellulari. EML338, ma soprattutto EML340, sono tra gli inibitori più efficaci della GST placentare (Figura 33), e dunque potrebbero esercitare un effetto inibitorio anche nei confronti delle GST cellulari nelle linee di melanoma, in particolare nei confronti della sovraespressa GSTP1-1.



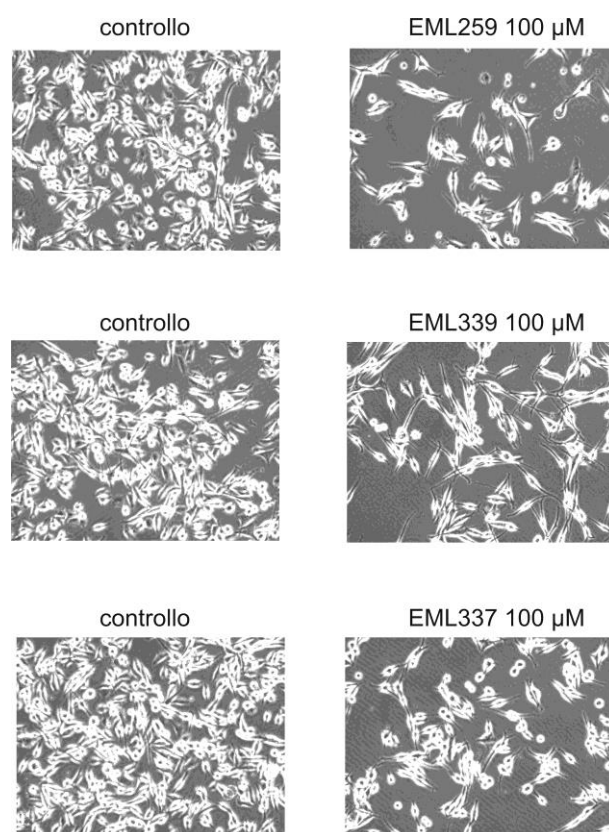
**Figura 36. Immagini a contrasto di fase di cellule A375 mantenute in coltura per 48 ore (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) in assenza (controllo) e in presenza di SASP, EML260, EML340, EML338 o dei rispettivi esteri metilici, alla concentrazione di 100 µM. La concentrazione di DMSO nel terreno di coltura era pari allo 0,1%.**

\* La forma esterificata della SASP (EML368) forma precipitati quando addizionata al terreno di coltura.

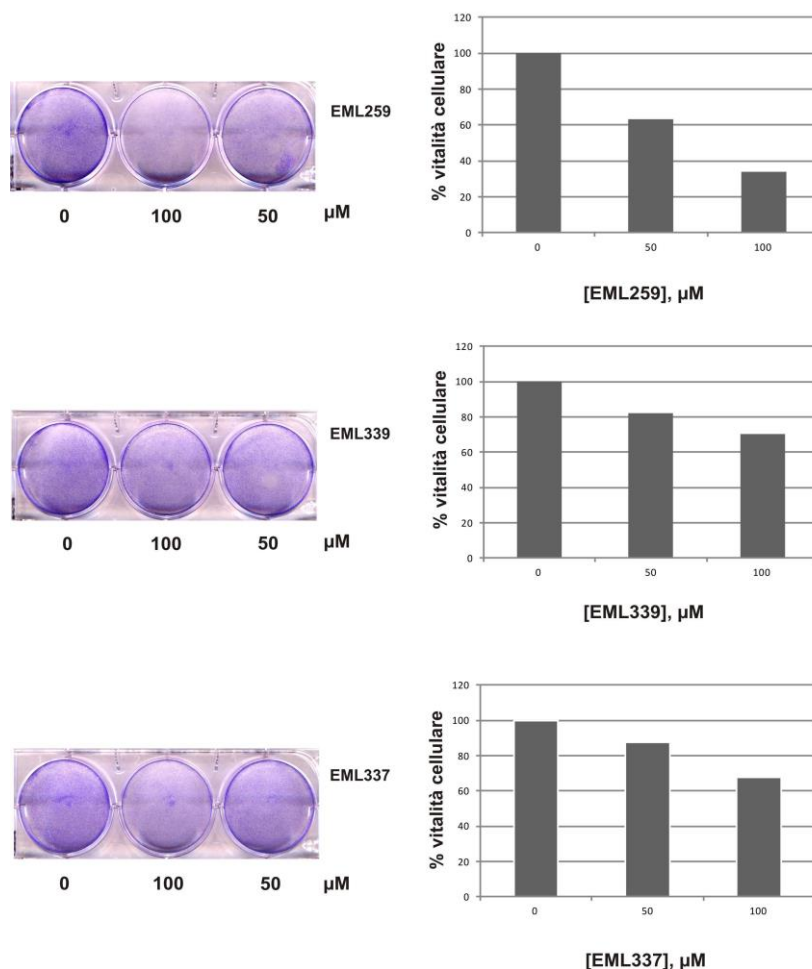


**Figura 37. Quantificazione dell'effetto citotossico nei confronti di cellule A375 dei composti SASP, EML260, EML340, EML338 e dei rispettivi esteri metilici, alla concentrazione di 50 e 100  $\mu\text{M}$ . I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard di  $n = 3$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti. Dettagli relativi alle condizioni di coltura cellulare, al fissaggio, alla colorazione e alla quantificazione delle cellule presenti in ciascun pozzetto sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".**

I derivati benzimidazolici EML259, EML337 ed EML339 sono stati successivamente testati, relativamente alla loro capacità di interferire con la crescita cellulare, anche sulla linea di melanoma umano SK-MEL 23. Per quanto preliminari (i dati si riferiscono infatti a due sole determinazioni) i risultati ottenuti suggeriscono che i tre composti siano in grado di interferire anche con la crescita di questa seconda linea cellulare. In particolare, dopo 48 ore di trattamento con EML259, EML337, ed EML339, alla massima concentrazione testata (100  $\mu$ M), è stata osservata una crescita cellulare pari rispettivamente al 34,2%, 67,8% e 70,4% del controllo (Figure 38 e 39).



**Figura 38.** Immagini a contrasto di fase di cellule SK-MEL 23 mantenute in coltura per 48 ore (37°C; 5% CO<sub>2</sub>) in assenza (controllo) e in presenza di EML259, EML339 o EML337, alla concentrazione di 100  $\mu$ M. La concentrazione di DMSO nel terreno di coltura era pari allo 0,1%.



**Figura 39. Quantificazione dell'effetto citotossico nei confronti di cellule SK-MEL 23 dei composti EML259, EML339, ed EML337, alla concentrazione di 50 e 100  $\mu\text{M}$ . I risultati sono espressi come media di  $n = 2$  determinazioni effettuate in esperimenti distinti. Dettagli relativi alle condizioni di coltura cellulare, al fissaggio, alla colorazione e alla quantificazione delle cellule presenti in ciascun pozzetto sono riportati nella sezione "Materiali e metodi".**

#### *4.2.4. Studio dell'interazione tra GSTP1-1 umana e derivati benzimidazolici: analisi relative al composto EML340*

Alcuni fra gli analoghi strutturali della SASP in esame sono stati oggetto di studi di modellistica molecolare, al fine di razionalizzare la loro interazione con la GSTP1-1 umana. Tali studi sono stati condotti presso il laboratorio diretto dal Prof. S. Moro (Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova). I risultati ottenuti relativi, in particolare, al composto EML340 (il composto dimostratosi l'inibitore più efficace nei saggi di inibizione della GST isolata da placenta), sono descritti in Appendice al presente elaborato di tesi.



## 5. CONCLUSIONI RIASSUNTIVE

In conclusione, i risultati riportati in questa tesi, frutto di esperimenti *in vitro*, suggeriscono quanto segue:

1) il 6-(7-nitro-2,1,3-benzossadiazol-4-iltio)esano (NBDHEX) e il suo analogo strutturale MC3181 sono composti suscettibili di metabolismo microsomiale epatico, in particolare sia di glucuronidazione sia di metabolismo ossidativo mediato da enzimi NADPH-dipendenti. Mentre la struttura del glucuronide di NBDHEX è nota grazie a studi NMR, rimane da chiarire la struttura del glucuronide dell'MC3181, così come quella dei prodotti del metabolismo ossidativo microsomiale epatico di entrambi i farmaci. L'identificazione definitiva di tali metaboliti richiederà necessariamente o la loro sintesi per via chimica o la loro purificazione da una miscela di reazione dei due farmaci con microsomi epatici e NADPH, seguita da studi NMR. Inoltre, l'NBDHEX, ma non l'MC3181, è suscettibile di biotrasformazione ad opera di enzimi citosolici richiedenti  $\text{NAD}^+$ . In tutte le specie studiate è stata osservata la formazione di un singolo metabolita citosolico del farmaco, la cui biosintesi sembra mediata da ADH. Anche in questo caso, l'identificazione definitiva del metabolita (rappresentato probabilmente, sulla base dei dati LC-DAD-MS/MS, dall'acido carbossilico derivante dall'ossidazione del gruppo ossidrilico della catena laterale dell'NBDHEX) richiederà ulteriori indagini. Lo studio ha messo inoltre in evidenza l'esistenza di differenze interspecie nella glucuronidazione sia dell'NBDHEX sia dell'MC3181, e nella biotrasformazione citosolica dell'NBDHEX; sono state infine osservate differenze tra i due sessi nel ratto, nella glucuronidazione dell'MC3181 e nella biotrasformazione citosolica dell'NBDHEX;

2) la sostituzione, nel contesto della molecola della SASP, del legame azoico e dell'anello piridinico rispettivamente con un anello imidazolico e con un anello tiazolico o una catena terz-butilica o isopropilica, conduce alla formazione di analoghi strutturali (EML340, EML277, EML259, ed EML337) con capacità di inibizione dell'attività coniugativa della GST isolata da placenta umana (principalmente GSTP1-1) superiore a quella dimostrata dalla molecola di riferimento (SASP). EML337 mostra un'inibizione preferenziale nei confronti della GSTP1-1 piuttosto che nei confronti delle forme GSTA1-1 e GSTM1-1. EML277 ed EML340 (entrambi caratterizzati dalla presenza di un nucleo

tiazolico) esibiscono invece marcata selettività d'azione nei confronti della forma GSTM1-1. Seppur preliminari, i risultati di studi di citotossicità nei confronti delle linee cellulari di melanoma umano A375 e SK-MEL 23, entrambe sovraesprimenti GSTP1-1, mostrano come solo i tre esteri metilici EML259, EML337 ed EML339 siano capaci di interferire con la crescita cellulare di entrambe le linee tumorali. Futuri studi saranno orientati a valutare la capacità di tali composti di sensibilizzare linee cellulari neoplastiche nei confronti di farmaci detossificati via GST.



## APPENDICE

### Studio dell'interazione tra glutatione trasferasi (GST) P1-1 umana e analoghi strutturali della sulfasalazina (SASP) a nucleo benzimidazolico: analisi relative al composto EML340

#### Materiali e metodi

Al fine di interpretare l'attività inibitoria del composto EML340 nei confronti della GSTP1-1 umana, le possibili modalità di riconoscimento ligando-proteina sono state studiate ricorrendo sia a simulazioni di *docking* molecolare sia all'impiego della metodologia computazionale definita *Supervised Molecular Dynamics* (SuMD) [Sabbadin e Moro, 2014].

La struttura cristallografica della GSTP1-1 complessata con SASP e glutatione ridotto (GSH), è stata ottenuta dalla banca dati “*Protein Data Bank*” (PDB code 13GS).

L'obiettivo della metodologia del *docking* molecolare è la predizione delle conformazioni più stabili di un ligando nel contesto del sito di legame della rispettiva proteina *target*. In particolare, lo spazio conformazionale del ligando considerato è esaminato grazie all'ausilio di specifici algoritmi, e la geometria del complesso proteina-ligando valutata sulla base della stabilizzazione energetica conferita dalle interazioni intermolecolari rappresentate, principalmente, da interazioni elettrostatiche, interazioni idrofobiche e legami ad idrogeno. Le conformazioni bioattive di un ligando sono generalmente rappresentate dalle geometrie più stabili che esso può assumere all'interno della tasca di legame.

Le cosiddette simulazioni di dinamica molecolare (MD) giocano frequentemente un ruolo di primaria importanza nello sviluppo di nuovi farmaci. Infatti, nonostante i modelli statici ottenuti mediante risonanza magnetica nucleare (NMR), cristallografia a raggi X e *homology modeling* forniscano preziose informazioni strutturali, il mutuo riconoscimento e il legame proteina-ligando rappresentano processi dinamici. Grazie alle simulazioni MD è possibile studiare l'evoluzione temporale dei sistemi chimici (risolvendo numericamente le equazioni del moto di Newton) e valutarne le proprietà cinetiche e termodinamiche (mediante l'applicazione delle regole definite dalla meccanica

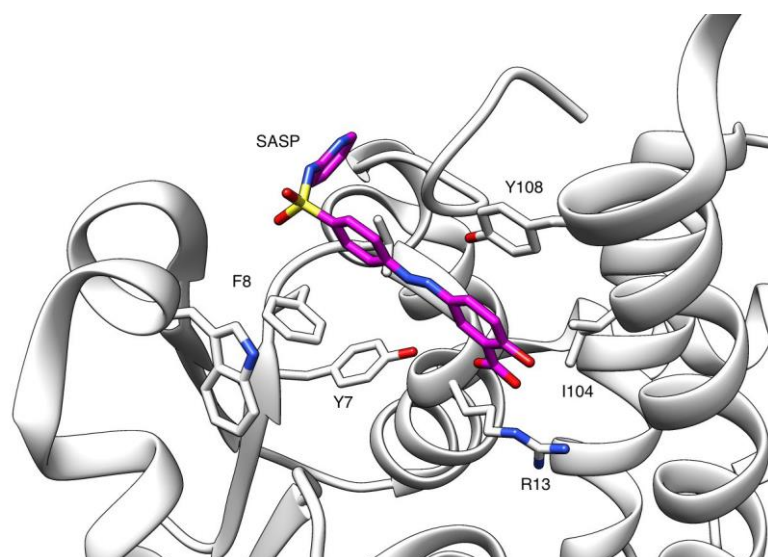
statistica, che permette di correlare le proprietà delle singole molecole alle proprietà macroscopiche del sistema che esse compongono).

## Risultati e discussione

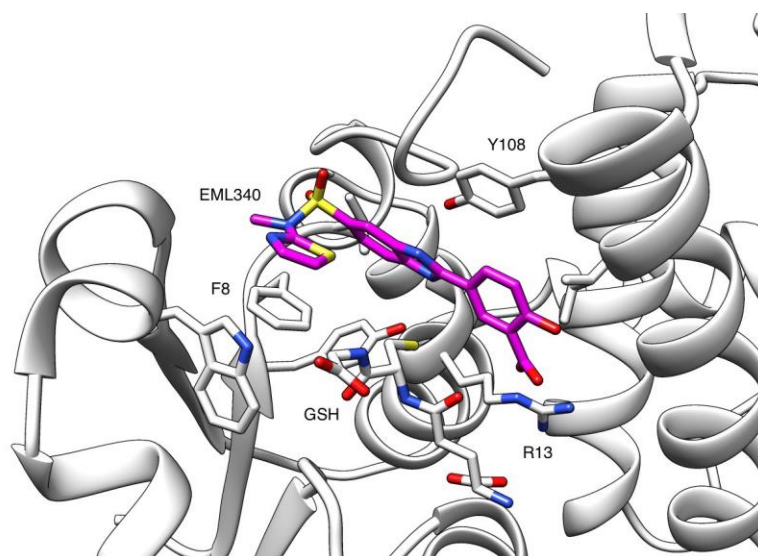
### Docking molecolare

L'analisi della struttura cristallografica del complesso SASP-GSTP1-1 evidenzia l'esistenza di quattro siti principali di interazione. Precisamente, l'inibitore instaura con la proteina: (a) un forte legame elettrostatico che vede coinvolti la forma ionizzata del gruppo carbossilico della sua estremità salicilica e l'Arg13, (b) due interazioni aromatiche ( $\pi$ - $\pi$ ) che coinvolgono la Phe8 and la Tyr108, e (c) un' interazione idrofobica con l'Ile104 (Figura A1).

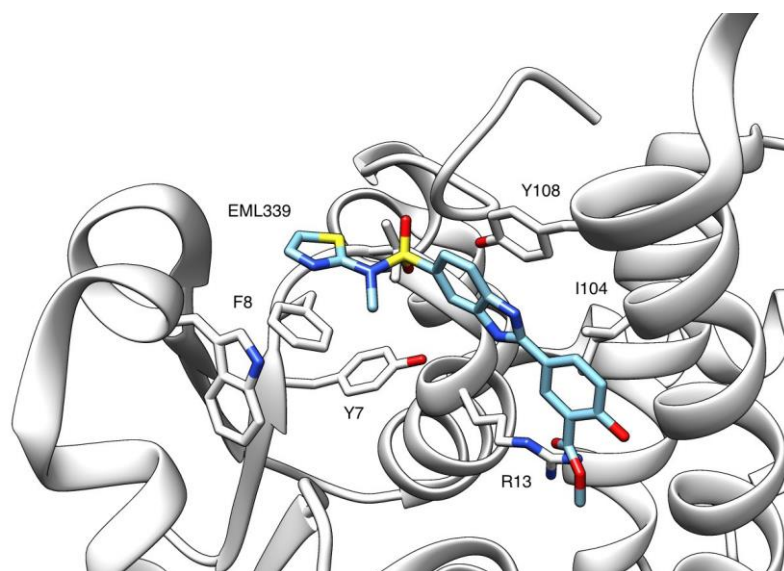
Le simulazioni di *docking* molecolare condotte sui composti EML340 e EML339 mostrano lo stesso profilo di interazione osservato nel caso della SASP (Figure A2 e A3).



**Figura A1. Struttura cristallografica del complesso GSTP1-1-SASP**

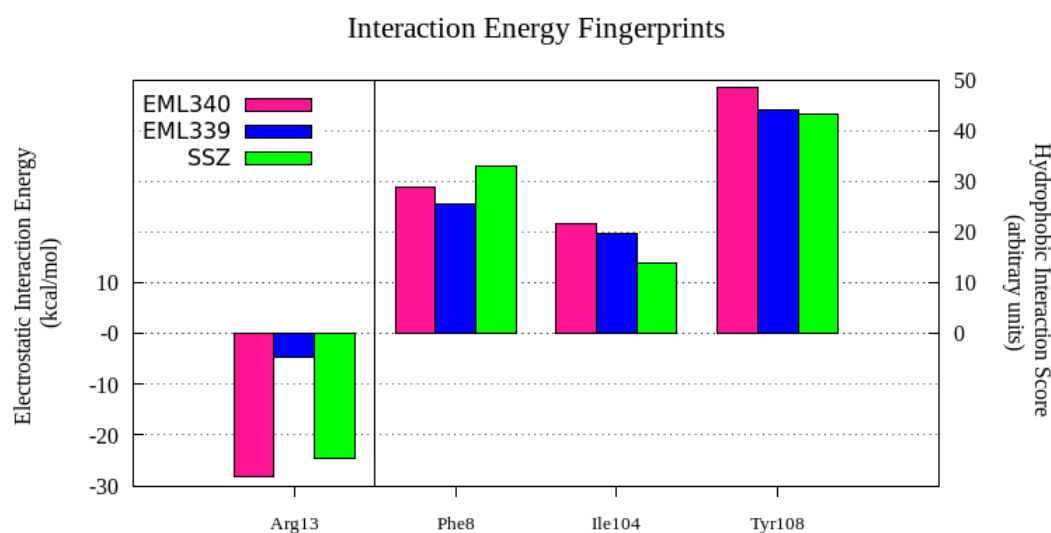


**Figura A2. Collocazione dell'EML340 nel contesto del sito catalitico della GSTP1-1**



**Figura A3. Collocazione dell'EML339 nel contesto del sito catalitico della GSTP1-1**

Mentre gli acidi carbossilici SASP ed EML340 sono in grado di instaurare un'interazione elettrostatica di analoga entità con l'Arg13, l'estere metilico EML339 è privo di densità di carica negativa e, di conseguenza, ottiene stabilizzazione energetica solamente grazie alla formazione di legami ad idrogeno ( $< 5$  kcal/mol) con il medesimo residuo amminoacidico (Figura A4). Non esistono invece differenza tra i tre composti per quanto riguarda le interazioni di tipo idrofobico.



**Figura A4. Interazione tra GSTP1-1 e SASP (SSZ), verde; EML339, blu; EML340, magenta**

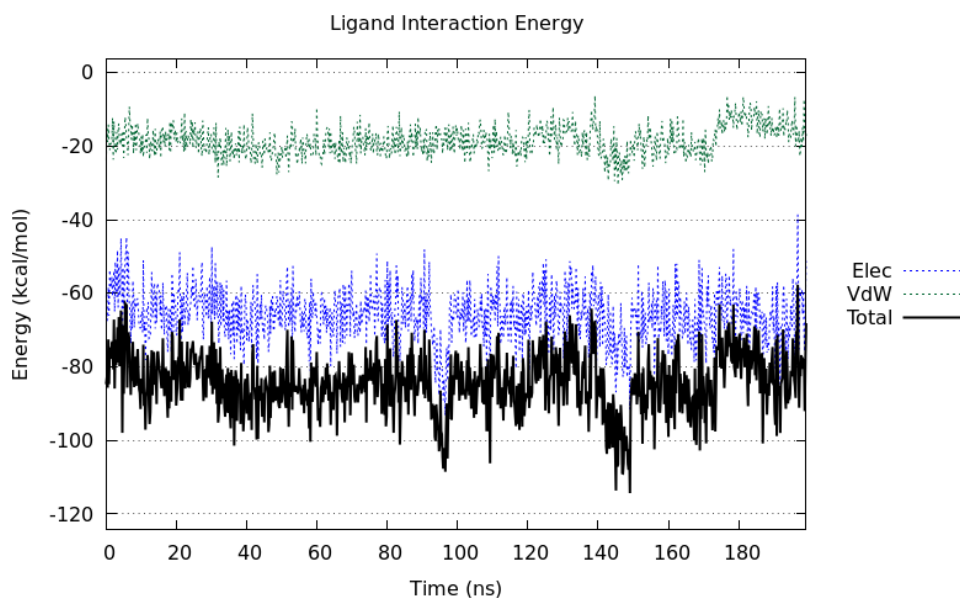
Nel loro complesso, i risultati delle simulazioni di *docking* molecolare evidenziano quindi come la sostituzione bioisosterica del gruppo azo tipico della SASP con un anello imidazolico consenta sia il mantenimento della geometria del complesso ligando-recettore sia il mantenimento di tutte le principali interazioni con i residui amminoacidici dell'enzima. Nel caso del composto EML339, l'assenza di stabilizzazione del complesso ligando-enzima attraverso formazione di un legame elettrostatico con l'Arg13, giustifica la scarsa potenza inibitoria manifestata nei confronti dell'attività catalitica della proteina.

### Simulazioni di dinamica molecolare

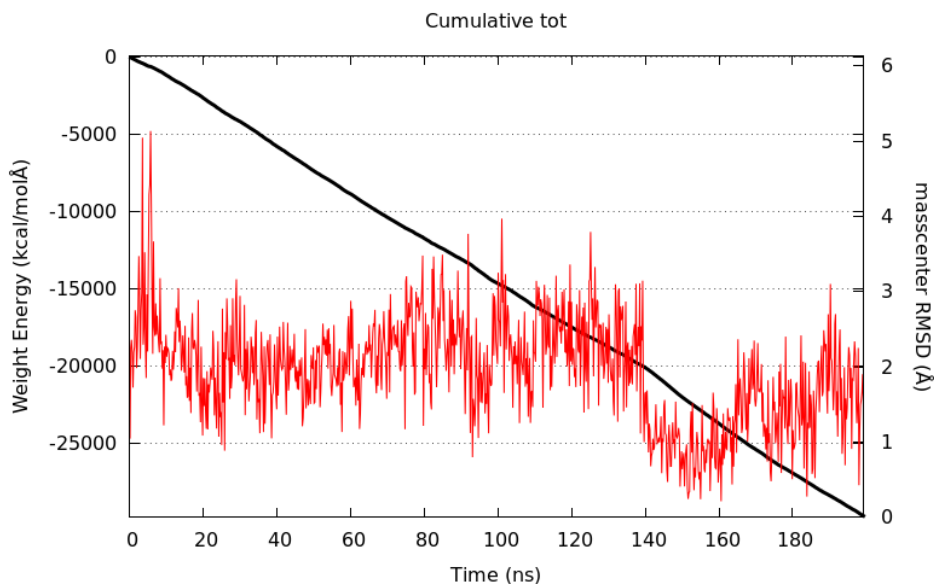
#### *a) Simulazione post-docking dell'EML340*

Al fine di valutare la stabilità, in funzione del tempo, del complesso EML340-GSTP1-1, è stata condotta una simulazione MD considerando, quale punto di partenza, la conformazione di *docking* molecolare; l'analisi è stata condotta in presenza, nel contesto del sito G, di GSH (condizioni fisiologiche). Nel corso dei 200 ns considerati, le energie di interazione ligando-proteina rimangono pressochè costanti, sia per quanto concerne le interazioni di van der Waals, sia per quanto riguarda le interazioni elettrostatiche (rispettivamente ~ -20 kcal/mol e -65 kcal/mol; Figura A5). Tale profilo energetico è spiegato mediante il calcolo della radice dello scarto quadratico medio (RMSD) degli atomi del ligando nel corso della simulazione. Rispetto alla posizione iniziale del ligando,

l'evoluzione temporale del sistema si caratterizza infatti per piccole fluttuazioni posizionali, generalmente  $\leq 3$  Å (Figura A6).



**Figura A5.** Energie di interazione tra EML340 e GSTP1-1 nel corso della simulazione MD *post-docking*



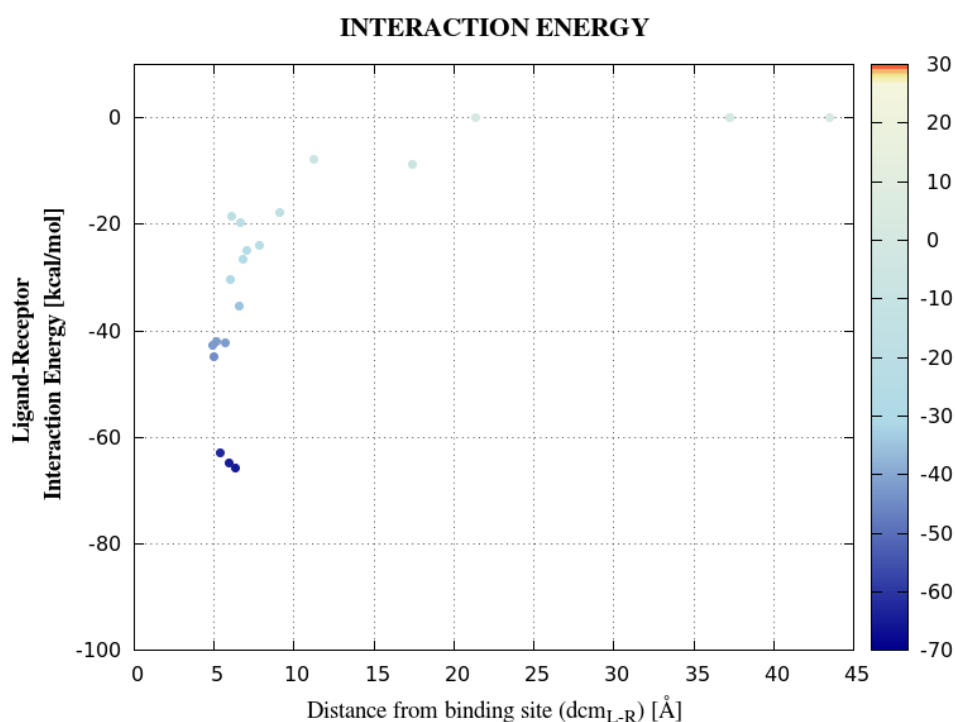
**Figura A6.** Energie cumulative di interazione tra EML340 e GSTP1-1 (linea nera) e RMSD di EML340 nel corso della simulazione MD *post-docking*

Al fine di valutare la capacità di riconoscimento, da parte dell'EML340, della regione H del sito catalitico della GSTP1-1, il *pathway* di interazione

ligando-proteina è stato successivamente analizzato mediante SuMD. Allo scopo di mimare sia le condizioni utilizzate nel corso degli esperimenti di inibizione enzimatica sia la situazione fisiologica (enzima in equilibrio con il GSH), le simulazioni sono state condotte sia in assenza sia in presenza del GSH nel contesto del rispettivo sito di legame (sito G).

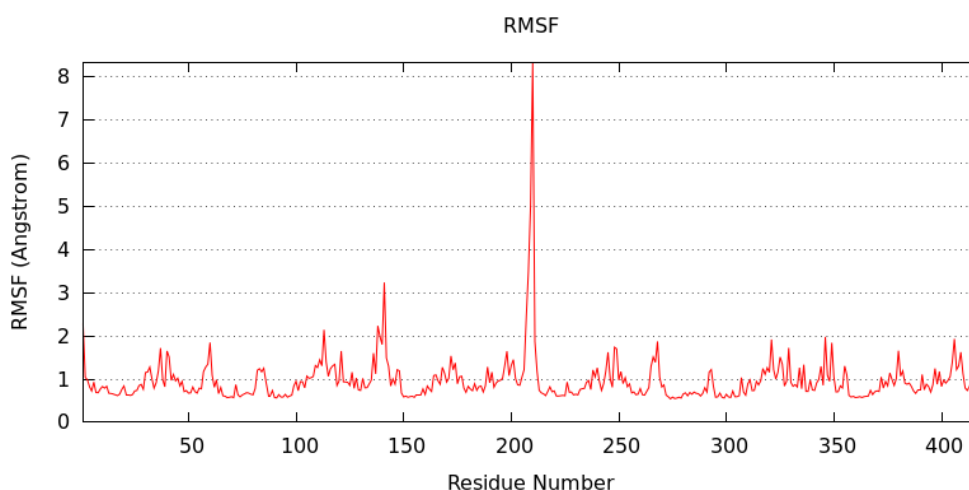
#### *b) Simulazione SuMD in presenza di GSH*

Le prime fasi del riconoscimento EML340-proteina sono rappresentate dall'inserzione dell'anello tiazolico del ligando all'interno della cavità lipofila dell'enzima formata dalle catene laterali dei residui amminoacidici Phe8, Trp38 e Val10. A ciò segue un cambio dell'orientazione dell'EML340 reso possibile da contatti idrofobici che coinvolgono la Val34, l'Ile104 e un'interazione  $\pi$ - $\pi$  fra l'anello benzimidazolico e la Tyr108. Questo *network* di interazioni consente il mantenimento della planarità del ligando e orienta il gruppo carbossilico dell'estremità salicilica verso il residuo Arg13, permettendo così la formazione di un legame elettrostatico. La stabilizzazione energetica del complesso finale calcolata è risultata superiore a 60 kcal/mol (Figura A7).



**Figura A7. Profilo energetico del processo di riconoscimento tra EML340 e GSTP1-1**

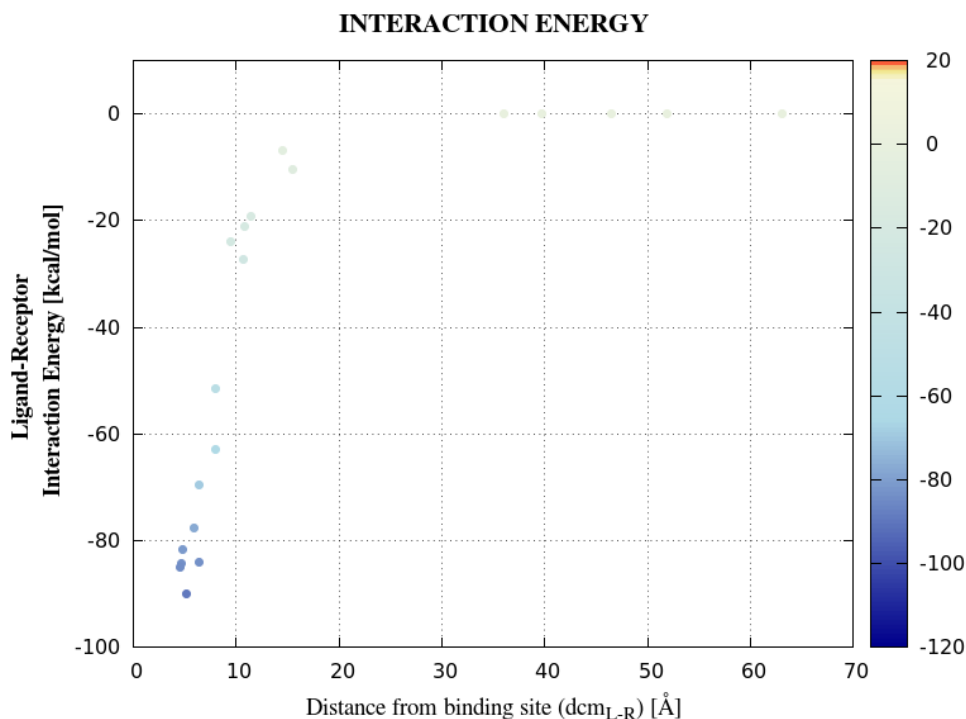
E' interessante notare come l'estremità C-terminale della catena polipeptidica sembri promuovere la formazione del complesso proteina-EML340 interagendo con l'inibitore nel corso della fase di riconoscimento (Figura A8). In particolare, durante tale fase, l'azoto del residuo di Gly206 contrae un legame ad idrogeno con uno dei due atomi di ossigeno del gruppo sulfonamidico del ligando.



**Figura A8.** Radice della fluttuazione quadratica media (RMSF) dei residui della GSTP1-1 durante la simulazione. L'RMSF rappresenta una misura statistica del movimento degli atomi che compongono la proteina. I residui che costituiscono il C-terminale corrispondono ai valori più elevati di RMSF.

### *c) Simulazione SuMD in assenza di GSH*

Come mostrato in Figura A9, la rimozione del GSH dal *G-site* consente all'EML340 di formare un complesso con la GSTP1-1 energeticamente più stabile ( $\sim 90$  kcal/mol), grazie alla possibilità di meglio orientare il proprio gruppo carbossilico. Tale geometria d'interazione ligando-proteina è raggiunta grazie ad eventi simili a quelli descritti in precedenza (vedi "*Simulazione SuMD in presenza di GSH*"); in questo caso, tuttavia, il riconoscimento non prevede due eventi in sequenza, poiché, vista l'assenza del GSH, il ligando è in grado simultaneamente di stabilire interazioni lipofiliche  $\pi$ - $\pi$  e dirigere il gruppo carbossilico verso l'Arg13. A dispetto della maggiore disponibilità di spazio nel contesto del sito catalitico, l'inibitore non sembra interagire con residui amminoacidici facenti parte del *G-site* ossia responsabili del riconoscimento del GSH.



**Figura A9. Profilo energetico del processo di riconoscimento tra EML340 e GSTP1-1 (in assenza di GSH)**

Esperimenti *in vitro* di inibizione enzimatica hanno dimostrato come la SASP si comporti da inibitore reversibile di tipo competitivo dell'attività coniugativa della GSTP1-1, interagendo con la proteina in corrispondenza del sito di legame del substrato prototipo CDNB (sito H) [Ahmad *et al.*, 1992; Oakley *et al.*, 1999]. I risultati degli studi di modellistica molecolare qui descritti suggeriscono un analogo scenario nel caso del composto EML340 (interazione con il sito H), e indicano inoltre la possibilità che il GSH, interagendo con il rispettivo sito di legame, possa ostacolare l'interazione di tale ligando con l'enzima. Il legame del GSH potrebbe, peraltro, stabilizzare stericamente il complesso ligando-enzima preformato.

Sulla base dei risultati dell'analisi *in silico* condotta, è possibile razionalizzare le relazioni struttura-attività dei composti della serie EML emerse dagli studi *in vitro* di inibizione enzimatica come segue:

a) l'interazione che conferisce maggiore stabilità al complesso inibitore-enzima è correlata alla presenza, nel contesto della molecola del ligando, di un gruppo carbossilico alla sua estremità (porzione salicilica);



- b) la planarità della struttura sembra essere essenziale ai fini di un corretto accomodamento nel contesto del sito H;
- c) la maggior potenza inibitoria degli analoghi caratterizzati dalla presenza del gruppo solfonamidico, rispetto ai composti dotati di una funzione carbossiammidica, potrebbe essere riconducibile alla presenza, nei primi, di due (anziché di uno) atomi di ossigeno in grado di interagire, attraverso la formazione di legami ad idrogeno, con l'estremità C-terminale della proteina.



## BIBLIOGRAFIA

Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 1999;18:1321-34.

Ahmad H, Singhal SS, Awasthi S. The inhibition of the  $\alpha$ ,  $\mu$  and  $\pi$  class isozymes of glutathione S-transferases by sulfasalazine, 5-aminosalicylic acid and sulfapyridine. *Biochem. Arch.* 1992;8:355-361.

Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 1997;10:2-18.

Ascione A, Cianfriglia M, Dupuis ML, Mallano A, Sau A, Pellizzari Tregno F, Pezzola S, Caccuri AM. The glutathione S-transferase inhibitor 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol overcomes the MDR1-P-glycoprotein and MRP1-mediated multidrug resistance in acute myeloid leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;64:419-24.

Awasthi S, Sharma R, Singhal SS, Herzog NK, Chaubey M, Awasthi YC. Modulation of cisplatin cytotoxicity by sulphasalazine. *Br. J. Cancer.* 1994;70:190-194.

Baranczewski P, Stańczyk A, Kautiainen A, Sandin P, Edlund PO. Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep.* 2006;58:341-52.

Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog.* 2007;46:591-8.

Burg D, Mulder GJ. Glutathione conjugates and their synthetic derivatives as inhibitors of glutathione-dependent enzymes involved in cancer and drug resistance. *Drug Metab Rev.* 2002;34:821-63.

Burg D, Riepsaame J, Pont C, Mulder G, van de Water B. Peptide-bond modified glutathione conjugate analogs modulate GSTpi function in GSH-conjugation, drug sensitivity and JNK signaling. *Biochem Pharmacol.* 2006;71:268-77.

Caccuri AM, Ascenzi P, Antonini G, Parker MW, Oakley AJ, Chiessi E, Nuccetelli M, Battistoni A, Bellizia A, Ricci G. Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Influence of a poor co-substrate on dynamics and kinetics of human glutathione transferase. *J Biol Chem*. 1996;271:16193-8.

Cho SG, Lee YH, Park HS, Ryoo K, Kang KW, Park J, Eom SJ, Kim MJ, Chang TS, Choi SY, Shim J, Kim Y, Dong MS, Lee MJ, Kim SG, Ichijo H, Choi EJ. Glutathione S-transferase mu modulates the stress-activated signals by suppressing apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*. 2001;276:12749-55.

Dahan A, Amidon GL. Small intestinal efflux mediated by MRP2 and BCRP shifts sulfasalazine intestinal permeability from high to low, enabling its colonic targeting. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G371-7.

Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000;103:239-52.

De Luca A, Pellizzari Tregno F, Sau A, Pastore A, Palumbo C, Alama A, Cicconi R, Federici G, Caccuri AM. Glutathione S-transferase P1-1 as a target for mesothelioma treatment. *Cancer Sci*. 2013;104:223-30.

De Luca A, Rotili D, Carpanese D, Lenoci A, Calderan L, Scimeca M, Mai A, Bonanno E, Rosato A, Geroni C, Quintieri L, Caccuri AM. A novel orally active water-soluble inhibitor of human glutathione transferase exerts a potent and selective antitumor activity against human melanoma xenografts. *Oncotarget*. 2014 Dec 18 [Epub ahead of print].

Dhanani S., Awasthi YC. Glutathione S-transferase isozyme composition of human tissues. In: Awasthi YC, Toxicology of glutathione transferases, Taylor & Francis Group, 2007.

Dorion S, Lambert H, Landry J. Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *J Biol Chem*. 2002;277:30792-7.

Elsby R, Kitteringham NR, Goldring CE, Lovatt CA, Chamberlain M, Henderson CJ, Wolf CR, Park BK. Increased constitutive c-Jun N-terminal kinase signaling in mice lacking glutathione S-transferase Pi. *J Biol Chem*. 2003;278:22243-9.

Federici L, Lo Sterzo C, Pezzola S, Di Matteo A, Scaloni F, Federici G, Caccuri AM. Structural basis for the binding of the anticancer compound 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol to human glutathione s-transferases. *Cancer Res*. 2009;69:8025-34.

Filomeni G, Turella P, Dupuis ML, Forini O, Ciriolo MR, Cianfriglia M, Pezzola S, Federici G, Caccuri AM. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol, a specific glutathione S-transferase inhibitor, overcomes the multidrug resistance (MDR)-associated protein 1-mediated MDR in small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:371-9.

Findlay VJ, Townsend DM, Saavedra JE, Buzard GS, Citro ML, Keefer LK, Ji X, Tew KD. Tumor cell responses to a novel glutathione S-transferase-activated nitric oxide-releasing prodrug. *Mol Pharmacol*. 2004;65:1070-9.

Gildenhuis S, Wallace LA, Burke JP, Balchin D, Sayed Y, Dirr HW. Class Pi glutathione transferase unfolds via a dimeric and not monomeric intermediate: functional implications for an unstable monomer. *Biochemistry*. 2010;49:5074-81.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. 1974;249:7130-9.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30:445-600.

Hayeshi R, Chinyanga F, Chenedza S, Mukanganyama S. Inhibition of human glutathione transferases by multidrug resistance chemomodulators in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2006;21:581-7.

Hinchman CA, Matsumoto H, Simmons TW, Ballatori N. Intrahepatic conversion of a glutathione conjugate to its mercapturic acid. Metabolism of 1-chloro-2,4-

dinitrobenzene in isolated perfused rat and guinea pig livers. *J Biol Chem.* 1991;266:22179-85.

Hoey K, Kerr S., Sarangarajan R. Effect of 4-tertiary butylphenol (4-TBP) on translation of glutathione-S-transferase (GST) isoforms in two melanoma cell lines. *Pigment Cell Res.* 2009;22:875; Abstr. N. 50.

Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life.* 2005;57:283-95.

Keppler D. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:985-91.

Klotz U. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *Clin Pharmacokinet.* 1985;10:285-302.

Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17:1373-80.

Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev.* 1997;49:403-49.

Lin JH. Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos.* 1995;23:1008-21.

Litwack G, Ketterer B, Arias IM. Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature.* 1971;234:466-7.

Luo W, Kinsey M, Schiffman JD, Lessnick SL. Glutathione s-transferases in pediatric cancer. *Front Oncol.* 2011;1:39.

Lyttle MH, Hocker MD, Hui HC, Caldwell CG, Aaron DT, Engqvist-Goldstein A, Flatgaard JE, Bauer KE. Isozyme-specific glutathione-S-transferase inhibitors: design and synthesis. *J Med Chem.* 1994a;37:189-94.

Lyttle MH, Satyam A, Hocker MD, Bauer KE, Caldwell CG, Hui HC, Morgan AS, Mergia A, Kauvar LM. Glutathione-S-transferase activates novel alkylating agents. *J Med Chem.* 1994b;37:1501-7.

Mannervik B, Board PG, Hayes JD, Listowsky I, Pearson WR. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 2005;401:1-8.

Morgan AS, Ciaccio PJ, Tew KD, Kauvar LM. Isozyme-specific glutathione S-transferase inhibitors potentiate drug sensitivity in cultured human tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1996;37:363-70.

Morgan AS, Sanderson PE, Borch RF, Tew KD, Niitsu Y, Takayama T, Von Hoff DD, Izbicka E, Mangold G, Paul C, Broberg U, Mannervik B, Henner WD, Kauvar LM. Tumor efficacy and bone marrow-sparing properties of TER286, a cytotoxin activated by glutathione S-transferase. *Cancer Res.* 1998;58:2568-75.

Mugford CA, Kedderis GL. Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev.* 1998;30:441-98.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996;6:1-42.

Oakley A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug Metab Rev.* 2011;43:138-51.

Oakley AJ, Lo Bello M, Nuccetelli M, Mazzetti AP, Parker MW. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J Mol Biol.* 1999;291:913-26.

Parkinson A. e Ogilvie BW. Biotrasformazione degli xenobiotici. In: Casaretti&Doull's - Tossicologia - I fondamenti dell'azione delle sostanze tossiche, VII edizione italiana, EMSI, 2010.

Pasello M, Manara MC, Michelacci F, Fanelli M, Hattinger CM, Nicoletti G, Landuzzi L, Lollini PL, Caccuri A, Picci P, Scotlandi K, Serra M. Targeting glutathione-S transferase enzymes in musculoskeletal sarcomas: a promising therapeutic strategy. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2011;34:131-45.

Pellizzari Tregno F, Sau A, Pezzola S, Geroni C, Lapenta C, Spada M, Filomeni G, Bonanno E, Federici G, Caccuri AM. In vitro and in vivo efficacy of 6-(7-

nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) on human melanoma. *Eur J Cancer*. 2009;45:2606-17.

Peppercorn MA. Sulfasalazine. Pharmacology, clinical use, toxicity, and related new drug development. *Ann Intern Med*. 1984;101:377-86.

Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2005;65:1825-49.

Quintieri L. Biotrasformazione dei farmaci. In: Dorigo P, Farmacologia generale III edizione, CEDAM, Padova, 2006, pp.144-173.

Raza A, Galili N, Smith SE, Godwin J, Boccia RV, Myint H, Mahadevan D, Mulford D, Rarick M, Brown GL, Schaar D, Faderl S, Komrokji RS, List AF, Sekeres M. A phase 2 randomized multicenter study of 2 extended dosing schedules of oral ezatiostat in low to intermediate-1 risk myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2012;118:2138-47.

Ricci G, De Maria F, Antonini G, Turella P, Bullo A, Stella L, Filomeni G, Federici G, Caccuri AM. 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione S-transferases. Mechanism of action of potential anticancer drugs. *J Biol Chem*. 2005;280:26397-405.

Romero L, Andrews K, Ng L, O'Rourke K, Maslen A, Kirby G. Human GSTA1-1 reduces c-Jun N-terminal kinase signalling and apoptosis in Caco-2 cells. *Biochem J*. 2006;400:135-41.

Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009;9:763-77.

Sabbadin D, Moro S. Supervised molecular dynamics (SuMD) as a helpful tool to depict GPCR-ligand recognition pathway in a nanosecond time scale. *J Chem Inf Model*. 2014;54:372-6.

Sau A, Filomeni G, Pezzola S, D'Aguzzo S, Tregno FP, Urbani A, Serra M, Pasello M, Picci P, Federici G, Caccuri AM. Targeting GSTP1-1 induces JNK activation and leads to apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant human osteosarcoma cell lines. *Mol Biosyst*. 2012;8:994-1006.



Sau A, Pellizzari Tregno F, Valentino F, Federici G, Caccuri AM. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. *Arch Biochem Biophys*. 2010;500:116-22.

Shapiro BH, Agrawal AK, Pampori NA. Gender differences in drug metabolism regulated by growth hormone. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995;27:9-20.

Stearn RA, Chakravarty PK, Cher R, Chiu SH. Biotransformation of losartan to its active carboxylic acid metabolite in human liver microsomes. Role of cytochrome P4502C and 3A subfamily members. *Drug Metab Dispos*. 1995;23:207-15.

Svensson S, Some M, Lundsjö A, Helander A, Cronholm T, Höög JO. Activities of human alcohol dehydrogenases in the metabolic pathways of ethanol and serotonin. *Eur J Biochem*. 1999;262:324-9.

Tew KD, Townsend DM. Glutathione-S-transferases as determinants of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17:1728-37.

Tew KD, Townsend DM. Regulatory functions of glutathione S-transferase P1-1 unrelated to detoxification. *Drug Metab Rev*. 2011;43:179-93.

Tingle MD, Helsby NA. Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies? *Environ Toxicol Pharmacol*. 2006;21:184-90.

Tomaru A, Morimoto N, Morishita M, Takayama K, Fujita T, Maeda K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Studies on the intestinal absorption characteristics of sulfasalazine, a breast cancer resistance protein (BCRP) substrate. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;28:71-4.

Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. 2003;22:7369-75.

Turella P, Cerella C, Filomeni G, Bullo A, De Maria F, Ghibelli L, Ciriolo MR, Cianfriglia M, Mattei M, Federici G, Ricci G, Caccuri AM. Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors. *Cancer Res*. 2005;65:3751-61.

Turella P, Filomeni G, Dupuis ML, Ciriolo MR, Molinari A, De Maria F, Tombesi M, Cianfriglia M, Federici G, Ricci G, Caccuri AM. A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated

resistance in tumor cells. 6-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells. *J Biol Chem*. 2006;281:23725-32.

Wang T, Arifoglu P, Ronai Z, Tew KD. Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem*. 2001;276:20999-1003.

Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol*. 2009;76:215-28.

Wrighton SA, Ring BJ, VandenBranden M. The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies. *Toxicol Pathol*. 1995;23:199-208.

Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M. First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics. *J Pharm Sci*. 2011;100:3655-81.

Wu Y, Fan Y, Xue B, Luo L, Shen J, Zhang S, Jiang Y, Yin Z. Human glutathione S-transferase P1-1 interacts with TRAF2 and regulates TRAF2-ASK1 signals. *Oncogene*. 2006;25:5787-800.

[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)

## RINGRAZIAMENTI

*Vorrei ringraziare molto il Supervisore della mia attività durante il Dottorato di Ricerca, il Dott. Luigi Quintieri, per il supporto, per la fiducia nei miei confronti, e per gli insegnamenti trasmessi.*

*Ringrazio il Direttore della Scuola di Dottorato in Scienze Farmacologiche, il Prof. Pietro Giusti, per l'opportunità di intraprendere questa esperienza formativa.*

*Ringrazio molto coloro che hanno collaborato al lavoro presentato in questa tesi: Dott. Daniele Dalzoppo, Prof. Stefano Moro, Dott. Giuseppe Deganutti, Dott. Massimo Bellanda, Dott. Alessandro Orsetti (Università degli Studi di Padova); Prof.ssa Anna Maria Caccuri e gruppo di ricerca (Università di Roma "Tor Vergata"); Prof.ssa Sabrina Castellano (Università degli Studi di Salerno); Dott.ssa Daniela Saggioro (Istituto Oncologico Veneto-IRCCS, Padova).*

*Grazie alle ragazze che hanno frequentato con me il laboratorio presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco, a chi tra loro ha contribuito al raggiungimento dei risultati qui descritti e a chi è diventata un'amica: Veronica, Linda, Francesca, Rezi, Nuria, Elisabetta, Antonietta.*

*Grazie a coloro che mi hanno accompagnato e aiutato nel lavoro quotidiano presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco.*

*Un grande grazie a Cristina e ai miei genitori, per essere sempre presenti.. Grazie a tutta la mia famiglia.*

*Grazie agli amici e alle persone che mi hanno incoraggiato e che hanno condiviso con me questi anni di Dottorato.*